

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :
CANCEROLOGIE

Présentée et soutenue par :
MAMOUNI Kenza

le : 25 Juin 2013

Titre :

Rôle de la GTPase RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN induits
par la camptothécine.

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037

Directeur(s) de Thèse :

Dr. SORDET Olivier
Pr. FAVRE Gilles

Rapporteurs :

Dr. DUBREZ Laurence
Dr. FORT Philippe
Dr. POURQUIER Philippe

Membre(s) du jury :

Dr. CANITROT Yvan (membre invité)
Dr. DUBREZ Laurence (rapporteuse)
Dr. FORT Philippe (rapporteur)
Dr. LARMINAT Florence (examinatrice)
Dr. POURQUIER Philippe (rapporteur)
Dr. SORDET Olivier (directeur de thèse)
Pr. FAVRE Gilles (co-directeur de thèse)

Remerciements

Merci à mes rapporteurs de thèse, le Dr. DUBREZ Laurence, le Dr. FORT Philippe et le Dr. POURQUIER Philippe. Merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant de lire et d'évaluer mon travail.

Merci au Dr. LARMINAT Florence d'avoir accepté de participer au jury de thèse en tant qu'examinatrice. Merci d'avoir été rapportrice de mon comité de thèse, merci pour vos conseils et pour la discussion très enrichissante qu'on a eu lors de ce comité.

Merci au Dr. CANITROT Yvan d'avoir accepté de participer au jury de thèse. Merci Yvan de m'avoir soutenu pendant ma thèse. Merci d'avoir été rapporteur de mon comité de thèse. Merci pour tes conseils, pour les discussions scientifiques qu'on a eu lors de mon comité de thèse.

Merci au Dr. SORDET Olivier, mon directeur de thèse, le meilleur encadrant de thèse au monde... Merci Olivier de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenu. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour tes qualités humaines irréprochables. J'espère qu'on continuera à discuter de nos projets de recherche.

Merci au Pr. FAVRE Gilles, mon co-directeur de thèse. Merci Gilles de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de faire ce travail de thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

Merci au Dr. FAYE Jean-Charles. Merci Jean-Charles de m'avoir conseillé dans mes réflexions et mes expériences scientifiques, merci pour la bonne ambiance que tu mets au labo...Tes blagues me manqueront !

Merci à CRISTINI Agnese. Merci Agnese pour tous les bons moments qu'on a passé au labo et hors labo, merci pour tout, bonne chance et bon courage pour la suite !!! Merci à MONFERRAN Sylvie, CASTINEL Adrien, LEMARIE Anthony, GUIROUILH-BARBAT Josée.

Merci à TEITI Iotefa (Merci infiniment IoIo de ton soutien et de ta gentillesse, tu as été vraiment adorable avec moi...Bon courage pour la fin de ta thèse), merci à la miss KELLER Laura (qu'est ce qu'on s'est marré toutes les deux !!! T'es une bosseuse, tu finiras par l'avoir ton anticorps, tu verras...bon courage), merci à BERY Nicolas (Nico, t'as toujours assuré avec moi, merci vraiment pour tout, bon courage pour ta dernière ligne droite !!), merci à CALVAYRAC

Olivier (merci Olivier pour tes encouragements, pour ta gentillesse, t'es vraiment adorable et sincère...Bonne chance pour la suite). Merci à GENCE Rémi, à BOUCHENOT Cathy, à KORAICHI Faten, à DELMAS Audrey, à CHERIER Julia, à SOULIE Marjorie, à JIMENA Guillaume.

Merci à CHINESTRA Patrick (merci pour ta sincérité et ta bonne humeur), CABANTOUS Stéphanie, TILKIN Anne-Françoise, PRADINES Anne, MEDALE Claire, LAJOIE Isabelle, Olichon Aurélien, MEYER Nicolas, FARELLA Magali, CASANOVA Anne, LEON Jeanine.

Merci à DE LA VIUDA Laura, HUET Isabelle, UNG Mony, NAKHLE Jessica, GOULLET DE RUGY Théo, des personnes formidables, qui ont été au labo et avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Merci aux autres membres de l'ICR que j'ai surtout côtoyé en salle de culture...Merci à DEMEDINA Philippe, PAILLASSE Michael, BACQUIER Elodie, VOISIN Maud, MARTINEZ GALA Judith...

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre au cours de ces années de thèse.

Merci à mes parents, ma soeur Latifa, mes frères Mohamed et Jaoued. Vous êtes ce que j'ai de plus cher.... Merci de m'avoir toujours supporté, encouragé...C'est à vous que je dédie cette thèse !!!!

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	4
ABREVIATIONS.....	5
RESUME	6
SUMMARY	7
INTRODUCTION	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	12

Chapitre I : La GTPase RhoB 12

<u>I.1 Présentation générale des GTPases Rho.....</u>	12
I.1.1 Arbre phylogénétique de la superfamille Ras.....	12
I.1.2 Structures et domaines des GTPases Rho.....	13
<u>I.2 Les fonctions générales des GTPases Rho</u>	15
<u>I.3 La GTPase RhoB</u>	15
I.3.1 Présentation générale de RhoB.....	15
I.3.2 Les différents mécanismes de régulation de la GTPase RhoB dans les conditions physiologiques	17
I.3.2.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression de RhoB	17
I.3.2.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de RhoB	18
I.3.2.3 Régulation post-traductionnelle de l'expression de RhoB	18
I.3.2.4 Régulation de l'activation de RhoB.....	20
I.3.3 Fonctions biologiques de RhoB.....	22
I.3.3.1 RhoB et cytosquelette d'actine	22
I.3.3.2 RhoB, adhérence et migration cellulaire	22
I.3.3.3 RhoB et trafic intracellulaire	23
I.3.3.4 RhoB et les facteurs de transcription.....	24
I.3.4 RhoB en réponse aux dommages à l'ADN.....	25
I.3.5 RhoB et oncogenèse	27

Chapitre II : La cassure double-brin..... 29

<u>II.1 Les différents types de dommages à l'ADN</u>	29
<u>II.2 La détection du dommage et l'activation d'une réponse cellulaire.....</u>	31
II.2.1 Activation d'ATM en réponse aux dommages à l'ADN.....	31
II.2.2 Activation d'ATR en réponse aux dommages à l'ADN	32
II.2.3 Activation de DNA-PK en réponse aux dommages à l'ADN	34
<u>II.3 Organisation de la réponse aux dommages aux sites des cassures</u>	34
II.3.1 La phosphorylation de l'histone H2AX	35
<u>II.4 La transduction du signal cellulaire aux dommages par les checkpoints.....</u>	38
II.4.1 La protéine Checkpoint kinase 2 (Chk2).....	38

II.4.1.1 Activation de Chk2 en réponse aux dommages à l'ADN	38
II.4.1.2 Les substrats de Chk2.....	40
II.4.1.2.1 La protéine HuR.....	41
II.4.1.2.1.1 Structure et fonctions de HuR	41
II.4.1.2.1.2 Régulation de HuR par Chk2	46
II.5 La déphosphorylation des protéines de la réponse aux dommages.....	47
II.5.1 La déphosphorylation de γ -H2AX	48
II.5.1.1 La phosphatase PP2A.....	51
II.5.1.1.1 Structure et fonctions de PP2A	51
II.5.1.1.2 Régulation de PP2A par des modifications post-traductionnelles	53
II.5.1.1.3 Rôle de PP2A dans la transformation cellulaire.....	54
II.6 La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN	55
II.6.1 La réparation des cassures double-brin	55
II.6.1.1 La réparation des cassures double-brin par jonction des extrémités non-homologues canonique (C-NHEJ).....	55
II.6.1.2 La réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH)	55
II.6.2 Exemples d'outils pour étudier la réparation des cassures double-brin	58

Chapitre III : Les inhibiteurs de la topoisomérase I..... 61

III.1 Les ADN topoisomérases	61
III.2 Fonctions biologiques de la topoisomérase I	63
III.2.1 Relaxation de l'ADN	63
III.2.2 Fonctions indépendantes de l'activité de relaxation de l'ADN	65
III.2.2.1 Rôles de la Topoisomérase I dans la transcription.....	66
III.2.2.2 Rôles de la topoisomérase I dans la signalisation des dommages à l'ADN	66
III.3 Stabilisation des complexes Top1-ADN.....	68
III.3.1 Stabilisation des complexes Top1-ADN par les inhibiteurs de Top1	68
III.3.2 Stabilisation des complexes Top1-ADN par les modifications de l'ADN	72
III.3.3 Stabilisation des complexes Top1-ADN dans les cellules apoptotiques	73
III.4 Dommages à l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérases I	76
III.4.1 Cassures double-brin de l'ADN induites par la réplication et réponse cellulaire	76
III.4.2 Cassures double-brin de l'ADN induites par la transcription et réponse cellulaire.....	77
RESULTATS.....	80
<u>ARTICLE</u>	80
« Chk2-dependent induction of RhoB facilitates γ -H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair ».....	80
<u>RESULTATS SUPPLEMENTAIRES</u>.....	81
Induction de la GTPase Rnd1 en réponse aux inhibiteurs de topoisomérases.....	81
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	83
REFERENCES.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la superfamille des GTPases Ras.	13
Figure 2 : L'organisation en domaines des GTPases Rho.	14
Figure 3 : Alignement des séquences primaires de RhoA, RhoB et RhoC.	16
Figure 4 : Prénylation des GTPases Rho à leur extrémité C-terminale.	20
Figure 5 : Le cycle d'activation des GTPases Rho.	21
Figure 6 : Les différents types de dommages à l'ADN.	29
Figure 7 : Activation de la kinase ATR.	33
Figure 8 : L'histone H2AX et le foyer γ -H2AX.	35
Figure 9 : La formation de γ -H2AX entraîne une cascade d'amplification de la signalisation des dommages à l'ADN.	37
Figure 10 : Structure et activation de la protéine Chk2.	40
Figure 11 : Représentation schématique de la protéine HuR.	42
Figure 12 : Fonctions nucléaires et cytoplasmiques de HuR.	43
Figure 13 : Sites de phosphorylation de HuR par les kinases induites en réponse aux dommages à l'ADN.	45
Figure 14 : La famille des sérine/thréonine phosphatases PP2A.	51
Figure 15 : Réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH) et ligature d'extrémités non-homologues canonique (C-NHEJ).	57
Figure 16 : Les systèmes rapporteurs du RH et du NHEJ.	60
Figure 17 : Classification des ADN topoisomérases humaines.	62
Figure 18 : Schémas des complexes de clivage des topoisomérases humaines.	63
Figure 19 : Cycle catalytique de la topoisomérase I nucléaire humaine.	65
Figure 20 : La stabilisation des complexes de clivage Top1-ADN par les inhibiteurs camptothécines et non-camptothécines.	70
Figure 21 : Les inhibiteurs de Top1.	71
Figure 22 : Voies moléculaires proposées pour la formation des complexes Top1-ADN apoptotiques.	75
Figure 23 : Conversion des complexes Top1-ADN stabilisés par la camptothécine en cassures double-brin lors de la réplication et la transcription.	79
Figure 24 : Modèle proposé du rôle de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN.	84

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Fréquences estimées du nombre de lésions de l'ADN physiologiques dans les cellules de mammifères.	30
Table 2 : Les substrats de Chk2.....	41
Table 3 : Liste partielle des ARNm cibles de HuR codant des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	44
Table 4 : Les phosphatases sérine/thréonine.	47
Table 5 : Les régulateurs positifs et négatifs des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.	48
Table 6 : Lésions endogènes et exogènes de l'ADN capables d'induire la formation de complexes de clivage ADN-Top1.	73
Table 7 : Agents connus pour induire des complexes Top1-ADN apoptotiques.	74

ABBREVIATIONS

CPT : Camptothécine

DSB : DNA double-strand break

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

GDP : Guanosine DiPhosphate

GTP : Guanosine TriPhosphate

Gy : Gray

kDA : kilodalton

KO : Knock-Out

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

miRNA : microRNA

NLS : Nuclear Localization Sequence

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

ROS : Reactive Oxygen Species

siRNA : small interfering RNA

TGF- β : Tumor Growth Factor β

RESUME

Rôle de la GTPase RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par la camptothécine.

RhoB est une GTPase impliquée dans diverses fonctions intracellulaires comme l'organisation du cytosquelette. En plus de ses rôles bien établis, RhoB a récemment émergé comme un gène de réponse précoce aux dommages à l'ADN. RhoB est surexprimée et activée en réponse à divers génotoxiques bien que les mécanismes d'induction et la relevance fonctionnelle de cette induction restent mal compris. RhoB possède également des propriétés de suppresseur de tumeurs. Son expression diminue lors de la progression tumorale et la perte de RhoB favorise la prolifération cellulaire et l'invasion. Pour étudier le rôle de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN et son implication potentielle dans la progression tumorale, nous avons utilisé la camptothécine (CPT), un inhibiteur sélectif de la topoisomérase I qui produit des cassures double-brin (DSBs) de l'ADN. Nous montrons que, dans les cellules traitées par la CPT, les DSBs induisent l'expression de RhoB par un mécanisme qui dépend de Chk2 et de son substrat HuR qui se lie à l'ARNm de RhoB et prévient sa dégradation. Des cellules déficientes en RhoB présentent un défaut de déphosphorylation de γ -H2AX après le retrait de la CPT, suggérant un défaut de réparation des DSBs. Ces cellules présentent également une diminution de l'activité de PP2A, une phosphatase pour γ -H2AX et d'autres protéines de la signalisation et de la réparation des dommages à l'ADN. Nous proposons que les DSBs activent une voie Chk2-HuR-RhoB qui favorise la déphosphorylation de γ -H2AX par PP2A. Enfin, nous montrons que les cellules déficientes en RhoB accumulent du γ -H2AX endogène et des anomalies chromosomiques, suggérant que la perte de RhoB augmente l'instabilité génomique induite par les DSBs et la progression tumorale.

Mots clés : RhoB, cassure double-brin, Chk2, γ -H2AX, PP2A, HuR, réparation de l'ADN, stabilité du génome.

SUMMARY

Role of the RhoB GTPase in the DNA damage response induced by camptothecin.

RhoB is a GTPase implicated in various intracellular functions such as cytoskeletal organization. Besides its well-established roles, RhoB recently emerged as an early DNA damage-inducible gene. RhoB is overexpressed and activated in response to various genotoxics although the mechanism of induction and functional relevance remain unclear. RhoB also possesses tumor suppressor properties. Its expression decreases during tumor progression and loss of RhoB promotes cell proliferation and invasion. To study the role of RhoB in the DNA damage response and its potential implication in tumor progression, we used camptothecin (CPT), a selective inhibitor of topoisomerase I that produces DNA double-strand breaks (DSBs). We show that, in CPT-treated cells, DSBs induce RhoB expression by a mechanism that depends on Chk2 and its substrate HuR that binds to and protects RhoB mRNA against degradation. RhoB deficient cells fail to dephosphorylate γ -H2AX following CPT removal suggesting defective DSB repair. These cells also show decreased activity of PP2A, a phosphatase for γ -H2AX and other DNA damage signaling and repair proteins. We propose that DSBs activate a Chk2-HuR-RhoB pathway that promotes PP2A-mediated dephosphorylation of γ -H2AX. Finally, we show that RhoB deficient cells accumulate endogenous γ -H2AX and chromosomal abnormalities, suggesting that RhoB loss increases DSB-mediated genomic instability and tumor progression.

Keywords: RhoB, DNA double-strand break, Chk2, γ -H2AX, PP2A, HuR, DNA repair, genome stability.

INTRODUCTION

RhoB est une protéine G appartenant à la famille des GTPases Rho comprenant 20 membres impliqués dans la signalisation intracellulaire. RhoB présente une forte homologie de séquence en acides aminés (près de 85% d'identité) avec deux autres membres de la famille des GTPases Rho : RhoA et RhoC. Comme la plupart des Rho GTPases, RhoB oscille entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Le passage de l'un à l'autre état est finement régulé par trois familles de protéines : les GEFs (Guanine Exchange Factor), les GAPs (GTPases Activating Proteins) et les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Les GEFs stimulent l'échange du GDP par du GTP pour générer la forme active de RhoB. Les GAPs accélèrent l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Rho afin de les inactiver. Quant aux GDIs, elles ont un rôle de séquestration cytoplasmique des protéines Rho liées au GDP (Wennerberg and Der, 2004). Lorsqu'elle est liée au GTP, RhoB peut interagir avec ses protéines effectrices stimulant ainsi une variété de processus cellulaires comme entre autres le trafic endocytaire, la migration et l'adhérence cellulaire (Jaffe and Hall, 2005).

RhoB est la seule GTPase décrite pour être un gène de réponse précoce à des stress génotoxiques tels que les rayonnements ultraviolets (UV) de types B et C et le cisplatine (Fritz et al., 1995 ; Canguilhem et al., 2005). Ces observations suggèrent que RhoB puisse jouer un rôle dans les mécanismes cellulaires de réponse aux dommages à l'ADN. En accord avec cette hypothèse, des souris KO pour RhoB ont une susceptibilité accrue à former des tumeurs de peaux induites chimiquement par le carcinogène DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene), un inducteur de dommages à l'ADN (Liu et al., 2001a). La surexpression de RhoB est due, au moins en partie, à une augmentation de la transcription de son gène par un mécanisme dépendant du récepteur à l'epidermal growth factor (EGF) (Canguilhem et al., 2005) et à la stabilisation de son ARN messenger par la protéine HuR qui se lie à l'ARNm (Westmark et al., 2005). Des travaux du laboratoire montrent que RhoB est activée (augmentation de la forme liée au GTP) en réponse aux UVB (Canguilhem et al., 2005) et aux radiations ionisantes (Monferran et al., 2008). L'activation de RhoB est transitoire et semble précéder l'augmentation de son expression en protéine en réponse aux UVB (Canguilhem et al., 2005). Néanmoins, les mécanismes

moléculaires d'induction de RhoB et son rôle potentiel dans la réponse aux dommages à l'ADN restent à éclaircir.

RhoB, à la différence de RhoA et de RhoC, semble avoir des propriétés de suppresseur de tumeurs. En effet, de nombreuses études soulignent une sous-expression de la protéine RhoB dans un certain nombre de cancers, notamment dans les cancers pulmonaires où l'expression de RhoB semble être inversement proportionnelle au grade de la tumeur (Mazieres et al., 2004 ; Sato et al., 2007), mais aussi dans les cancers de la sphère ORL (Adnane et al., 2002b), les glioblastomes (Forget et al., 2002) et les cancers gastriques (Zhou et al., 2011). Ces observations suggèrent que la diminution d'expression de RhoB puisse jouer un rôle dans la progression tumorale. Si les mécanismes à l'origine de la diminution d'expression de RhoB dans les tumeurs restent à éclaircir, il apparaît néanmoins que son expression serait réprimée, au niveau transcriptionnel, par l'histone déacétylase 1 (HDAC 1) dans des lignées tumorales pulmonaires humaines (Wang et al., 2003). En accord avec le rôle suppresseur de tumeurs de RhoB, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que la surexpression de RhoB inhibe la croissance des tumeurs et la formation de métastases (Chen et al., 2000 ; Jiang et al., 2004 ; Couderc et al., 2008).

La topoisomérase I (Top1) est une enzyme essentielle qui relaxe l'ADN compacté dans les régions en cours de transcription et de réplication (Wang, 2002). La Top1 relaxe l'ADN en produisant transitoirement des complexes de clivage Top1-ADN qui correspondent à des coupures simple-brin de l'ADN associées à la Top1 (Wang, 2002). Immédiatement après la relaxation de l'ADN, la Top1 relie les extrémités des coupures et redonne à l'ADN son intégrité initiale. La « religation » rapide de ces complexes de clivage est inhibée par de nombreuses lésions de l'ADN d'origine endogène et exogène comme des altérations de base (oxydation, alkylation, mésappariement de bases, perte de bases), des adduits carcinogéniques ou encore des cassures simple-brin de l'ADN (Pourquier and Pommier, 2001). Les complexes Top1-ADN peuvent également être stabilisés avec une très grande sélectivité par la camptothécine (CPT), un alcaloïde de plante dont les dérivés solubles irinotecan et topotecan sont utilisés dans le traitement des cancers du colon, de l'ovaire et du poumon (Pommier, 2006). La CPT stabilise les cassures simple-brin associées à la Top1 en s'insérant spécifiquement dans l'interface

entre la Top1 et l'ADN ce qui ralentit la « religation » des coupures. La stabilisation des complexes de clivage par la CPT entraîne la production de cassures double-brin (DSBs) de l'ADN lors de la réplication et de la transcription. Lors de la réplication, les cassures simple-brin associés à la Top1 sont converties en DSBs par la collision entre une fourche de réplication et un complexe Top1-ADN (Furuta et al., 2003). Lors de la transcription, le blocage de l'ARN polymérase II par un complexe Top1-ADN entraîne la production d'une DSB par un mécanisme dépendant des R-loops qui sont des structures d'acide nucléique à 3 brins composées d'un hybride ARN:ADN et d'un ADN simple-brin identique à la molécule d'ARN (Sordet et al., 2009 ; Sordet et al., 2010). D'un point de vue mécanistique, la CPT est un outil moléculaire puissant pour disséquer les voies de signalisation des DSBs puisqu'elle n'a pas d'autre cible cellulaire connue que la Top1. La CPT a également l'avantage de stabiliser réversiblement les complexes Top1-ADN. En effet, les complexes Top1-ADN reversent complètement dans les minutes qui suivent le retrait de la CPT du milieu de culture (Pommier, 2006).

Les DSBs sont parmi les lésions les plus sévères et un défaut de réparation peut entraîner des translocations chromosomiques et une instabilité génomique avec les conséquences potentielles qui en découlent (initiation et/ou progression tumorale, malformations congénitales), d'où un intérêt majeur de comprendre les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (Bonner et al., 2008 ; Jackson and Bartek, 2009). Les kinases ATM, ATR et DNA-PK sont rapidement activées par les DSBs et phosphorylent de nombreuses protéines de la réponse aux dommages à l'ADN aux sites des cassures, incluant l'histone H2AX, 53BP1 et Chk2 (Shiloh, 2006). Le recrutement de ces protéines aux sites des DSBs est requis pour une réparation efficace des DSBs (Lukas et al., 2011). La phosphorylation de ces protéines est essentielle pour activer des voies de signalisation ou « checkpoints » qui arrêtent la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire, coordonnent les processus de réparation et éventuellement induisent la mort cellulaire (Shiloh, 2006). Ces phosphorylations sont réversibles et prises en charge par des sérine/thréonine phosphatases comme PP2A, PP4, PP1, PP6 et Wip1 (Freeman and Monteiro, 2010). De récentes études soulignent l'importance de la déphosphorylation des protéines de la réponse aux dommages dans la réparation des DSBs (Chowdhury et al., 2005 ; Kalev et al., 2012).

L'objectif de la thèse a consisté à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de RhoB en réponse aux DSBs ainsi qu'à comprendre le rôle fonctionnel de cette induction. Tout au long de l'étude, nous avons utilisé un modèle de cellules humaines et murines traitées par la CPT.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La GTPase RhoB

I.1 Présentation générale des GTPases Rho

I.1.1 Arbre phylogénétique de la superfamille Ras

Les GTPases Rho appartiennent à la superfamille Ras des petites protéines G monomériques, de faible masse moléculaire (20 à 30 kDa). La superfamille Ras, divisée en cinq principales sous-familles (**figure 1**), est impliquée dans divers processus cellulaires dont les principales fonctions sont :

- Ras est impliquée dans la régulation de l'expression génique, de la prolifération, différenciation, morphologie cellulaire et de l'apoptose.
- Rho est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, la progression du cycle cellulaire, la transcription cellulaire.
- Arf/Sar contrôle le trafic vésiculaire, en particulier au niveau de l'appareil de Golgi.
- Ran est impliquée dans la régulation du transport nucléo-cytoplasmique et dans l'organisation des microtubules lors de la mitose.
- Rab régule le trafic vésiculaire intracellulaire.

La famille Rho comporte chez les mammifères 20 membres divisés en 8 sous-familles en fonction de leurs homologies de séquences (**figure 1**) (Vega and Ridley, 2008).

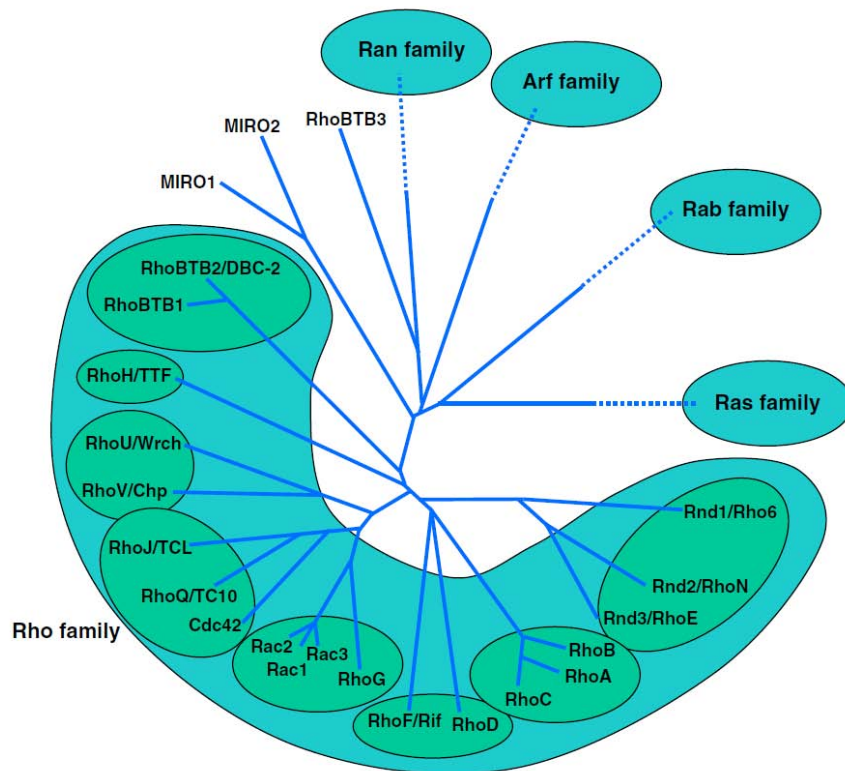


Figure 1 : Arbre phylogénétique de la superfamille des GTPases Ras.

Les 20 membres de la famille des GTPases Rho sont groupés en 8 sous-familles. Les protéines RhoBTB3, MIRO1 et MIRO2 initialement incluses sont exclues de la famille Rho par leur manque d'un domaine spécifique au Rho, appelé « région d'insert » de 12 acides aminés (Boureux et al., 2007).

(D'après Vega and Ridley, 2008)

I.1.2 Structures et domaines des GTPases Rho

Les protéines GTPases Rho partagent environ 30% d'identité avec les GTPases Ras et entre 40 à 95% d'identité entre elles (Wennerberg and Der, 2004). Elles sont composées de plusieurs domaines : la partie N-terminale qui comprend les régions impliquées dans la liaison au GTP ou au GDP et jouant un rôle important dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs (Wheeler and Ridley, 2004). L'essentiel des différences de séquence primaire entre les protéines Rho se situe principalement dans la partie C-terminale appelée région hypervariable (**figure 2**).

Les GTPases Rho présentent à leur extrémité C-terminale une séquence sujette à des modifications post-traductionnelles par des isoprényltransférases (Wennerberg et al., 2005). En effet, la plupart des GTPases Rho sont farnésylées ou géranylgeranylées sur la cystéine (C) de leur séquence consensus CAAX. Ces modifications lipidiques en C-terminale des GTPases Rho sont essentielles à leur localisation subcellulaire, ce qui permet de les mettre en contact avec leurs effecteurs (Wennerberg and Der, 2004).

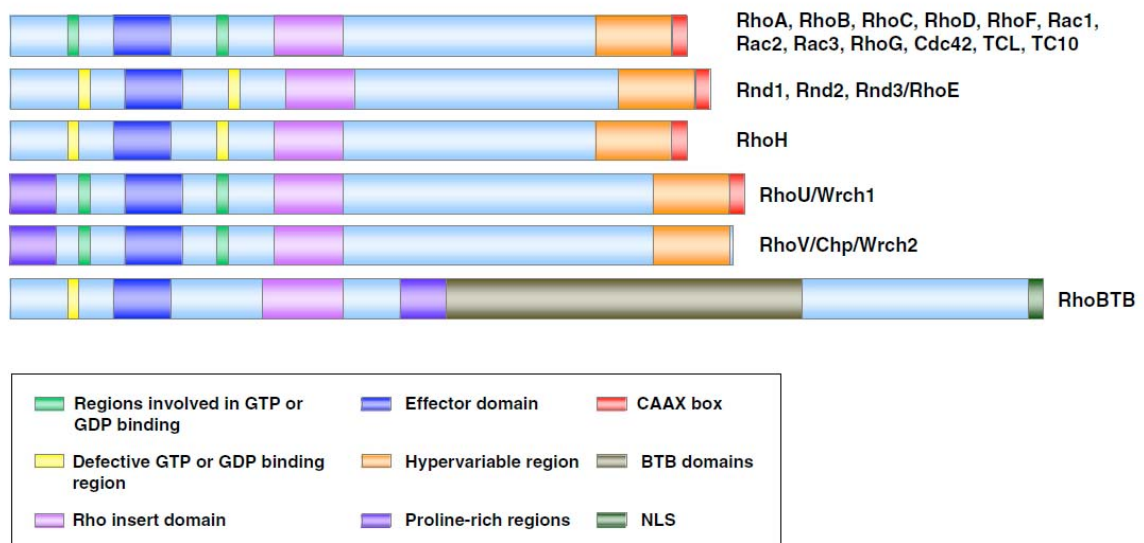


Figure 2 : L'organisation en domaines des GTPases Rho.

RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoF, Rac1, Rac2, Rac3, RhoG, Cdc42, TCL et TC10 partagent une structure en domaines similaire. Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE et RhoH présentent des modifications dans la région liant les nucléotides, ce qui leur confère une incapacité d'hydrolyse du GTP. Wrch1 et Wrch2 sont caractérisées par la présence d'une région riche en proline à l'extrémité N-terminale. RhoBTB1 et RhoBTB2 ont l'organisation la plus divergente puisqu'elles possèdent deux séquences de localisation nucléaire (NLS).

(D'après Vega and Ridley, 2008)

I.2 Les fonctions générales des GTPases Rho

Les GTPases Rho ont tout d'abord été décrites pour réguler l'organisation du cytosquelette d'actine (Hall, 1998). De par leur fonction sur l'organisation du cytosquelette d'actine mais également sur celle des microtubules, les GTPases Rho contrôlent la motilité, la morphologie et la polarité cellulaire, l'adhésion intercellulaire et à la matrice extracellulaire, ainsi que le trafic vésiculaire exo- et endocytair (Ridley, 2006). Elles se sont aussi révélées être des pivots majeurs dans de nombreux processus fondamentaux tels que l'expression génique, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'équilibre survie/apoptose (Raftopoulou and Hall, 2004 ; Burridge and Wennerberg, 2004).

De par leur action sur des fonctions cellulaires souvent perturbées lors des processus cancéreux, les GTPases Rho jouent un rôle majeur dans la transformation cellulaire (Sahai and Marshall, 2002 ; Karlsson et al., 2009). Contrairement aux GTPases de la famille Ras, aucune mutation n'a été détectée dans les gènes codant pour les GTPases Rho dans les tumeurs, à l'exception de RhoH dont le gène est muté dans certains lymphomes B (Ridley, 2004 ; Gomez del Pulgar et al., 2005). Cependant, certaines GTPases Rho sont retrouvées surexprimées ou suractivées dans un certain nombre de cancers (la revue de Karlsson et al., 2009 détaille l'expression et l'activation des GTPases Rho dans les tumeurs).

I.3 La GTPase RhoB

I.3.1 Présentation générale de RhoB

Les séquences primaires des protéines RhoA, RhoB et RhoC sont identiques à 85% (Wheeler and Ridley, 2004). Les trois protéines présentent une très forte homologie de séquence dans la région N-terminale (Bishop and Hall, 2000). L'essentiel des différences entre les séquences des trois protéines se trouve dans la région C terminale, dite région hypervariable (**figure 5**). Cette région C terminale contient les sites de modifications post-traductionnelles et détermine la localisation intracellulaire des protéines (Wheeler and Ridley, 2004).

	1	<u>effector domain</u>
RhoA	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDG	
RhoB	MAAIRKKLVVVG DGACGKTCLLIVFSKDEFPEVYVPTVFENYVADIEVDG	
RhoC	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYIADIEVDG	
	50	
RhoA	KQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPD TDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWT	
RhoB	KQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPD TDVILMCFSVDSPDSLENIPEKWV	
RhoC	KQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPD TDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWT	
	100	
RhoA	PEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANR	
RhoB	PEVKHFPCNPVPIILVANKKDLRSD EHVRT ELARMKQEPVRTDDGRAMAVR	
RhoC	PEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVRS EEGRDMANR	
	150	
RhoA	IGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL	
RhoB	IQA YDYLECSAKTKEGVREVFETATRAALQKRYGSQNGCINCCKVL	
RhoC	ISAFGYLECSAKTKEGVREVFEMATRAGLQVRKNKRRRGCPIL	

Figure 3 : Alignement des séquences primaires de RhoA, RhoB et RhoC.

Le domaine effecteur et les sites de prénylation et palmitoylation de RhoA, RhoB et RhoC sont soulignés. Les différences d'acides aminés de RhoB comparé à RhoA sont en vert. Les différences d'acides aminés de RhoC par rapport à RhoA sont en rouge.

(D'après Ridley, 2013)

Le gène *rhoB* est localisé sur le chromosome 2 (2p24), alors que les gènes *rhoA* et *rhoC* sont respectivement localisés sur le chromosome 3 (3p21.3) et sur le chromosome 1 (1p13.1). Sans séquence intronique, *rhoB* est constitué d'un seul exon. Le site d'initiation de la transcription se situe à la position -376 et la région promotrice minimale se situe entre -507 et -376 (Nakamura et al., 1996). La région promotrice de *rhoB* contient des séquences régulatrices comme les boîtes TATA, CAAT et Sp1 (Fritz and Kaina, 1997). De plus, *rhoB* présente dans sa région promotrice une séquence VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) de 34 pb entre la position -1124 et -821. La présence de cette séquence VNTR a été décrite comme diminuant l'activité transcriptionnelle de *rhoB*, ce qui lui confère un rôle potentiel dans la régulation de l'expression de RhoB (Tovar et al., 2003).

De plus, RhoB présente certaines caractéristiques biochimiques et biologiques qui la distinguent de ses homologues RhoA et RhoC. L'ARNm et la protéine de RhoB ont un turn-over rapide (demie-vie de 20 minutes et 120 minutes, respectivement) alors que les autres GTPases ont une demie-vie de l'ordre de 24 heures (Campbell et al., 1998 ; Zohn et al., 1998). L'expression de RhoB augmente à la transition G1/S du cycle cellulaire pour atteindre un maximum en phase S et diminuer à la transition S/G2 (Zalcman et al., 1995). Aussi, bien que son expression soit ubiquitaire, l'expression basale constitutive de RhoB est régulée selon le type de cellule et de tissu (Fritz et al., 1999).

L'expression de la protéine RhoB est rapidement induite par des facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF, et le TGF- β (de Cremoux et al., 1994 ; Jahner and Hunter, 1991 ; Nakamura et al., 1996 ; Zalcman et al., 1995).

I.3.2 Les différents mécanismes de régulation de la GTPase RhoB dans les conditions physiologiques

Les différents mécanismes de régulation de la GTPase RhoB qui permettent un contrôle spatio-temporel précis nécessaire à son activité et à ses fonctions vont être détaillés.

I.3.2.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression de RhoB

Des travaux suggèrent que l'activité transcriptionnelle de *rhoB* est régulée par des mécanismes épigénétiques (Wang et al., 2003 ; Mazieres et al., 2007 ; Sato et al., 2007). L'expression du gène *rhoB* est réprimée par l'histone déacétylase 1 (HDAC1) dans des lignées cellulaires cancéreuses du poumon (Sato et al., 2007; Wang et al., 2003). Aussi, une étude du laboratoire montre que le traitement de cellules cancéreuses pulmonaires par de la Trichostatin A (TSA), un inhibiteur de HDAC entraîne une augmentation de l'activité du promoteur de *rhoB* ainsi qu'une surexpression de la protéine RhoB. Cet effet n'est pas observé après un traitement des cellules par la 5-Azacytidine, un inhibiteur de méthyltransférase (Mazieres et al., 2007). Ceci suggère que la régulation de l'expression de *rhoB* se fait probablement via des mécanismes d'acétylation d'histones. L'augmentation de l'activité du promoteur de *rhoB* induite par le TSA n'est pas observée après délétion d'une région en 5' du promoteur qui contient des séquences VNTR,

suggérant que l'activité transcriptionnelle de *rhoB* puisse être régulée par ces séquences VNTR (Mazieres et al., 2007).

I.3.2.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de RhoB

Les miRNAs sont de courts ARNs, non codants, qui contrôlent l'expression des gènes post-transcriptionnellement (Bartel, 2004). Dans la majorité des cas étudiés à ce jour, les miRNAs s'apparient à un ou plusieurs ARNm sur leur partie 3' non traduite (3'UTR) entraînant leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction (Bartel, 2004). De nombreux miRNAs ont été impliqués dans la régulation de l'expression des GTPases Rho, jouant ainsi sur leurs fonctions (Liu et al., 2012). La partie 3'UTR de l'ARNm de RhoB possède plusieurs sites spécifiques de fixation pour différents miRNAs : miRNA-223 (Sun et al., 2010), miRNA-19 (Glorian et al., 2011), miRNA-21 (Connolly et al., 2010 ; Liu et al., 2011). Le miRNA-21, un miRNA surexprimé dans de nombreux cancers, notamment dans les cancers du sein et les glioblastomes (Asangani et al., 2008), favorise la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion, les métastases et la survie cellulaire, au moins en partie en inhibant l'expression de RhoB (Liu et al., 2011).

I.3.2.3 Régulation post-traductionnelle de l'expression de RhoB

Les GTPases Rho subissent des modifications lipidiques en C-terminal qui sont requises à leurs localisations subcellulaires (**figure 3**), et par conséquent à leurs interactions avec leurs effecteurs spécifiques (Mitin et al., 2012). Ces modifications lipidiques post-traductionnelles consistent au greffage covalent d'un lipide isoprénique sur la cystéine 193 du motif CAAX (C-cystéine, A- acide aminé aliphatique et X- acide aminé terminal qui dicte la spécificité prényltransférase). Si X est une méthionine ou une sérine, la farnésyl transférase transfère un farnésyl. Si X est une leucine ou une isoleucine, la géranylgéranyl transférase I transfère un groupe géranylgéranylé. La liaison entre la cystéine et le lipide est catalysée par la FTase (Farnésyl Transférase) pour la fixation d'un groupement farnésyl ou par la GGTase I (Géranylgéranyl Transférase) pour la fixation d'un groupement géranylgéranyl (Reid et al., 2004). Ensuite, le peptide AAX est clivé par l'endoprotéase Rce1 (Ras-converting enzyme 1), puis la carboxyméthylation de la cystéine par l'enzyme Icmt (isoprenylcysteine-O-carboxyl methyltransferase) catalyse l'addition d'un groupement méthyle au résidu cystéine prénylé.

RhoB peut être prénylée avec un groupement farnésyl de 15 carbones ou avec un groupement géranylgéranyl de 20 carbones (Baron et al., 2000). Cette différence a un impact sur la localisation subcellulaire de RhoB, qui est majoritairement à la membrane plasmique, aux endosomes tardifs et aux lysosomes. RhoA et RhoC sont uniquement géranylgéranylées et sont retrouvées dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique (Adamson et al., 1992 ; Michaelson et al., 2001).

RhoB peut être également palmitoylée (addition réversible d'un acide palmitique par thioestérification sur un résidu cystéine) sur deux résidus cystéines (Cys 189 et Cys 192), en amont de la cystéine 193 (le site de prénylation) (Adamson et al., 1992). La mutation de la cystéine 193 en sérine (C193S) prévient la palmitoylation de RhoB, suggérant que la prénylation de la cystéine 193 est requise pour la palmitoylation des cystéines 189 et 192 (Perez-Sala et al., 2009 ; Wang and Sebt, 2005). La mutation de la cystéine 192 en sérine (C192S) prévient la localisation de RhoB aux endosomes, alors que la mutation de la cystéine 189 n'a pas d'effet sur sa localisation (Adamson et al., 1992). La palmitoylation est une modification post-traductionnelle nécessaire pour les activités anti-tumorales et pro-apoptotiques de RhoB (Wang and Sebt, 2005).

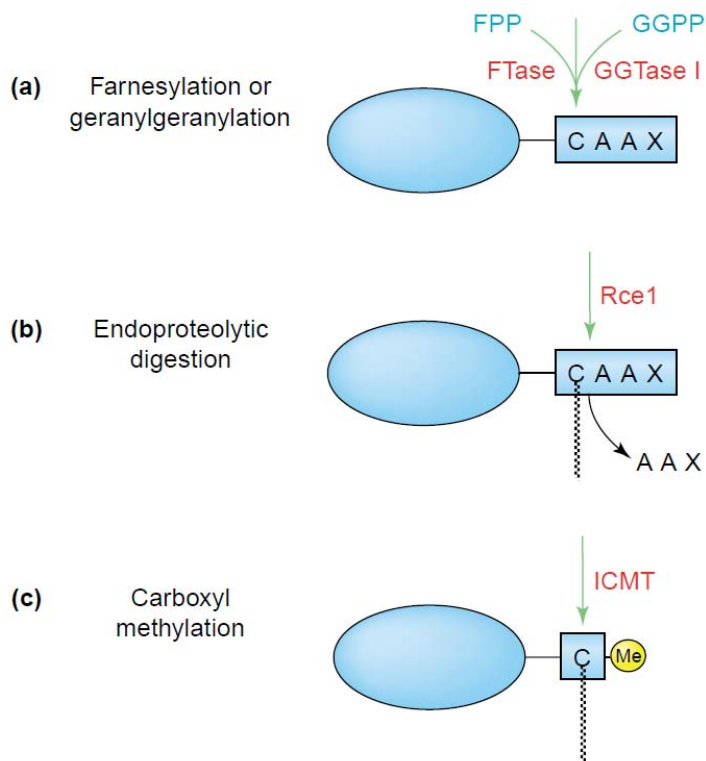


Figure 4 : Prénylation des GTPases Rho à leur extrémité C-terminale.

a-Addition d'un groupement farnésyl à quinze carbones par la FTase en utilisant le farnésyl pyrophosphate (FPP) comme donneur ou d'un groupement géranylgeranyl à vingt carbones par la GGTase I en utilisant le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) comme donneur.

b-Digestion endoprotéolytique des trois derniers acides aminés par l'endopeptidase RceI

c-Méthylation de la cystéine modifiée par la isoprenylcystéine-O-carboxyl méthyltransférase (ICMT)

(D'après Walker and Olson, 2005)

I.3.2.4 Régulation de l'activation de RhoB

Comme la grande majorité des Rho GTPases, RhoB cycle entre deux états conformationnels interconvertibles : un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Le passage de l'un à l'autre est finement régulé par trois familles de protéines : les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor), les GAPs (GTPase Activating Proteins) et les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Les GEFs stimulent l'échange du GDP par du GTP pour générer la forme activée qui sera capable d'interagir avec ses

effecteurs. Les GAPs accélèrent l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Rho afin de les inactiver. Quant aux GDIs, elles ont un rôle de séquestration cytoplasmique des protéines Rho liées au GDP (Wennerberg and Der, 2004). Ces régulateurs sont eux-mêmes soumis à une régulation très sophistiquée décrite dans une revue récente (Cherfils and Zeghouf, 2013).

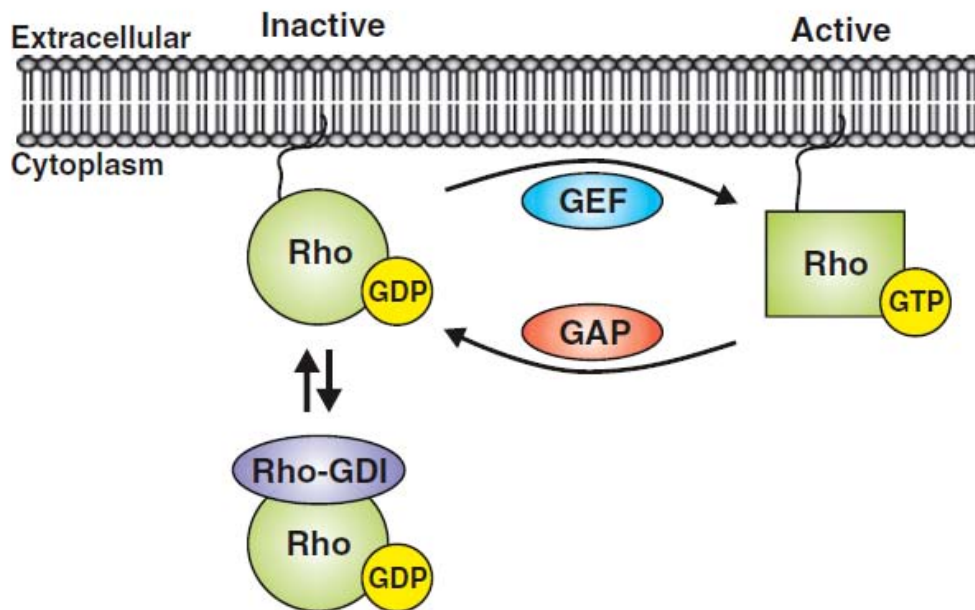


Figure 5 : Le cycle d'activation des GTPases Rho.

Les Rho-GDIs (Rho-GDP Dissociation Inhibitors) séquestrent la forme inactive Rho-GDP dans le cytoplasme. Une fois libérées des Rho-GDIs, les Rho-GTPases sont ciblées à la membrane plasmique où leur cycle d'activation est régulé par les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui permettent le chargement en GTP et l'activation des Rho-GTPases. L'inactivation des Rho-GTPases se fait via les GAPs (GTPase Activating Proteins) qui permettent l'hydrolyse du GTP en GDP.

(D'après Huveneers and Danen, 2009)

La plupart des régulateurs du cycle d'activation (GEF, GAP et GDI) n'ont été analysés que sur les GTPases Rho les plus étudiées, à savoir RhoA, Rac1 et Cdc42. Les spécificités particulières à l'intérieur d'une sous-famille, notamment au sein de la sous-

famille Rho, restent encore mal connues. Des expériences de surexpression de la GEF XPLN dans les cellules Hela et NIH-3T3 montrent que XPLN active RhoB et aussi RhoA mais pas RhoC (Arthur et al, 2002). En accord avec son rôle d'activation, l'expression transitoire de XPLN dans des cellules NIH3T3 stimule la formation de fibres de stress et de points focaux d'adhésion (Arthur, 2002). Aussi, RhoB est activée par la GEF-H1 dans des cellules dendritiques (Kamon et al, 2006) et par les GEFs nucléaires Ect2 et Net1 en réponse à des radiations ionisantes (Srougi and Burrige, 2011). Aucune GAP et GDI spécifique de RhoB n'ont été identifiés à ce jour.

I.3.3 Fonctions biologiques de RhoB

Je vais vous présenter les principales fonctions biologiques décrites pour RhoB.

I.3.3.1 RhoB et cytosquelette d'actine

Comme son homologue RhoA, la protéine RhoB est impliquée dans la formation des fibres de stress d'actine. L'expression exogène d'un mutant constitutivement actif de RhoB augmente la formation de fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhésion dans des cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2002). RhoB est nécessaire au réarrangement du cytosquelette d'actine induit par le TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) dans les cellules Swiss-3T3 (Vardouli et al., 2005). Dans les cellules PC12, l'inhibition de RhoB par ARNi, prévient l'organisation du cytosquelette d'actine induite par le LPA (lysophosphatidic acid) (Ishida et al., 2004). Si la prénylation de RhoB est essentielle à sa fonction sur le cytosquelette d'actine (Lebowitz et al., 1997), cette fonction ne semble pas dépendre de la nature du prényl. En effet, un mutant de RhoB exclusivement farnésylable et un mutant RhoB exclusivement géranylgéranylable présentent la même capacité à induire des fibres de stress et des points focaux d'adhésion dans les cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2002).

I.3.3.2 RhoB, adhérence et migration cellulaire

Le rôle de RhoB dans l'adhérence et la migration cellulaire est sujet à controverse. L'expression ectopique de RhoB inhibe la migration de cellules NIH-3T3 et l'invasion de cellules PANC-1 (Jiang et al., 2004) et diminue les métastases pulmonaires de mélanomes

chez la souris (Jiang et al., 2004). En accord avec ses observations, des études du laboratoire montrent que l'inhibition de l'expression de RhoB par siRNA et shRNA augmente la migration et l'invasion de cellules bronchiques humaines BEAS-2B via la voie de signalisation PI3K/AKT (Bousquet et al., 2009). La même étude montre chez la souris une augmentation significative du potentiel métastatique de cellules BKR transduites par shRNA RhoB (Bousquet et al., 2009). Cependant, des études *in vitro* indiquent que RhoB pourrait au contraire favoriser la migration cellulaire. En effet, des MEFs RhoB^{-/-} présentent une motilité réduite sur support fibronectine par rapport à des MEFs RhoB^{+/+} (Liu et al., 2001b) et RhoB favorise la motilité de cellules cancéreuses prostatiques DU145 *via* GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) (Yoneda et al., 2010).

I.3.3.3 RhoB et trafic intracellulaire

La localisation de la protéine RhoB dans les endosomes précoces et tardifs (Adamson et al., 1992 ; Robertson et al., 1995) a suggéré une implication potentielle de RhoB dans le trafic endocytaire. RhoB est impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur à l'EGF (EGFR) (Mellor et al., 1998 ; Gampel et al., 1999). La surexpression de RhoB dans des cellules HeLa retarde le transport de l'EGFR du compartiment endosomal précoce vers le compartiment endosomal tardif (Gampel et al., 1999). La régulation du trafic intracellulaire de l'EGFR par RhoB se fait via la kinase PRK1 ((Protein Kinase C)-Related Kinase 1). En effet, la surexpression d'un mutant RhoB incapable de se lier à la kinase PRK1 n'a pas d'effet sur le trafic de l'EGFR (Gampel et al., 1999).

Une autre étude montre que la surexpression de la forme active de RhoB induit une rétention des endosomes sur les fibres d'actine et empêche leur transfert aux microtubules, ce qui inhibe la fusion et le transport des cargos endosomaux aux lysosomes (Fernandez-Borja et al., 2005). RhoB permet le trafic des endosomes le long des fibres d'actine par l'intermédiaire de l'effecteur Dia1 (Fernandez-Borja et al., 2005). La protéine formine Dia1 agit en aval de RhoB pour permettre la polymérisation de l'actine sur les endosomes. De ces études découle une hypothèse selon laquelle Dia1 et PRK1 coopèrent dans la régulation du trafic endosomal en aval de RhoB, avec Dia1 à travers la polymérisation de l'actine sur les endosomes et PRK1 à travers la phosphorylation de cibles inconnues.

En ayant un rôle dans la localisation nucléaire des protéines Akt et GSK-3 (Glycogène Synthase Kinase 3) (Adini et al., 2003 ; Huang et al., 2006), RhoB est impliquée dans la fonction de ces protéines. L'inhibition de RhoB prévient la localisation d'Akt au noyau dans des cellules endothéliales primaires de rétine, défavorisant ainsi leur survie (Adini et al., 2003). Aussi, RhoB contrôle le turnover de l'oncogène c-Myc en contribuant à la localisation nucléaire de la kinase GSK-3, qui permet la dégradation protéique de c-Myc (Huang et al., 2006).

I.3.3.4 RhoB et les facteurs de transcription

RhoB est impliquée dans la régulation de nombreux facteurs de transcription. Une stratégie de double-hybride a mis en évidence l'interaction de RhoB avec le facteur de transcription DB1 (Lebowitz and Prendergast, 1998), un facteur de transcription ubiquitaire impliqué notamment dans l'activation du promoteur de l'interleukine-3 (Koyano-Nakagawa et al., 1994). RhoB inhibe l'activation de la transcription de l'interleukine-3 induite par DB1, vraisemblablement via la séquestration du facteur de transcription (Lebowitz and Prendergast, 1998). De plus, RhoB réprime la transcription du récepteur au TGF- β de type II en empêchant la liaison du facteur de transcription AP-1 sur le promoteur (Adnane et al., 2002b). En régulant AP-1, il est envisageable que RhoB soit impliquée dans la régulation d'autres gènes. La protéine RhoB est aussi impliquée dans la régulation du facteur de transcription NF κ B, responsable de la transcription de nombreux gènes contrôlant l'apoptose. RhoB inhibe l'activation de NF κ B induite par l'agent alkylant MMS (methyl methanesulfonate), notamment en empêchant la translocation de NF κ B dans le noyau (Fritz and Kaina, 2001a). RhoB augmente la transcription de NOS-2 (nitric oxyde synthase 2) induite par des cytokines (Delarue et al., 2001) et NOS-2 est décrite dans l'inhibition de l'invasion et de la formation de métastases *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, en régulant de nombreux facteurs de transcription, RhoB est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes.

I.3.4 RhoB en réponse aux dommages à l'ADN

rhoB est un gène de réponse précoce à divers agents endommageants l'ADN tels que les rayonnements ultraviolets (UV) de types B et C (Westmark et al., 2005 ; Fritz and Kaina, 1997 ; Canguilhem et al., 2005 ; Fritz et al., 1995), le cisplatine et l'agent alkylant MNU (N-Methyl-N-nitrosurea) (Fritz et al., 1995). La protéine RhoB est activée en réponse aux radiations ionisantes (Monferran et al., 2008) et aux UVB (Canguilhem et al., 2005). Une étude montre la surexpression de RhoB dans des cellules MCF-7 après 6h de traitement aux inhibiteurs de farnésyltransférase (FTIs) FTI-276 et L-744832, qui engendrent des cassures double-brin *via* la formation de ROS (reactive oxygen species) (Pan and Qian, 2005). En plus de RhoB, les GTPases RhoC et RhoE sont induites en réponse à certains génotoxiques mais à des temps relativement longs de traitement. Le taux d'ARNm de RhoC est augmenté après 24 heures de traitement au cisplatine (Croft et al., 2011) et l'expression protéique de RhoE est augmentée après 16 heures de traitement aux UVB (Boswell et al., 2007).

Les quelques données sur les mécanismes d'induction de RhoB et sa fonction en réponse aux dommages à l'ADN ont été décrites en réponse aux rayonnements UV et aux radiations ionisantes.

RhoB en réponse aux rayonnements ultraviolets (UV)

La régulation de RhoB sous UV se fait *via* des mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels.

Le promoteur du gène *rhoB* ne présente pas de séquences consensus pour les facteurs de transcription AP-1, c-Jun, ATF-2, Elk-1 et CHOP (gadd153), connus pour être activés sous UV (Fritz and Kaina, 1997). Cependant, l'activation transcriptionnelle de *rhoB* est augmentée sous UV *via* le co-recrutement du facteur NF-YA et du facteur de transcription ATF-2 sur une séquence CCAAT présente sur le promoteur du gène *rhoB* (Fritz and Kaina, 2001b).

Le taux d'ARNm de RhoB est augmenté en réponse aux UVs (Fritz et al., 1995 ; Fritz and Kaina, 1997 ; Canguilhem et al., 2005 ; Westmark et al., 2005) *via* notamment l'augmentation de la stabilité de l'ARNm de RhoB par la protéine de liaison aux ARNm, HuR (Westmark et al., 2005) (cf § II.4.1.2.1 : La protéine HuR).

Des travaux du laboratoire montrent que la régulation de RhoB après exposition aux UVs nécessite deux étapes : une activation précoce de RhoB (RhoB-GTP) indépendante de l'EGFR, suivie d'une induction de l'expression de RhoB dépendante de l'EGFR (Canguilhem et al., 2005). Aussi, il a été mis en évidence une régulation traductionnelle de RhoB sous UV *via* l'action interdépendante du microARN miR-19 et de la protéine de liaison aux ARN, HuR (Glorian et al., 2011). Les auteurs montrent une levée de la répression traductionnelle de l'ARNm de *rhoB* sous UV *via* la dissociation de HuR et du miRNA-19 de l'ARNm de *rhoB*.

La surexpression de la protéine RhoB sous UV permet de protéger les cellules de kératinocytes humains immortalisées (HaCat) de l'apoptose induite par les UV *via* l'EGFR et la voie de signalisation Akt/GSK-3 β (Canguilhem et al., 2005).

RhoB en réponse aux radiations ionisantes

La protéine RhoB joue un rôle dans la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes et ce rôle pourrait dépendre du type cellulaire. L'équipe du Pr Prendergast suggère l'implication de RhoB dans la sensibilité aux radiations ionisantes dans des fibroblastes embryonnaires murins co-transformés par l'adénovirus E1A et par l'oncogène H-Ras (cellules appelées ER). Les cellules ER *rhoB*^{-/-} sont plus résistantes que les cellules ER *rhoB*^{+/-} à l'apoptose induite par les radiations ionisantes. De plus, la réexpression de la protéine RhoB dans les cellules *rhoB*^{-/-} restaure leur sensibilité aux radiations ionisantes (Liu et al., 2001a). En accord avec ces résultats, la surexpression de RhoB en réponse aux radiations ionisantes, dépendante de c-jun, participe à l'apoptose induite par les rayonnements ionisants dans des cellules Jurkat (Kim et al., 2010a). Cependant, d'autres études réalisées au laboratoire impliquent RhoB dans la radiorésistance de cellules NIH-3T3 (Milia et al., 2005), de glioblastomes humain (U87) (Delmas et al., 2002) et de cellules HeLa (Ader et al., 2002). La surexpression de RhoB dans des lignées radiosensibles induit une augmentation de la survie après traitement par des radiations ionisantes. Cet effet implique la forme farnésylée de RhoB et serait dû à une diminution de la mort post-mitotique *via* à une prolongation de l'arrêt en G2/M (Milia et al., 2005). Dans un modèle de glioblastome humain radiorésistant (U87), l'inhibition de RhoB induit une radiosensibilisation *in vitro* et *in vivo* en régulant à la fois des mécanismes de survie cellulaire et aussi le micro-environnement tumoral (Ader et al., 2003).

I.3.5 RhoB et oncogénèse

Le rôle de RhoB dans l'oncogénèse s'est révélé avec l'étude des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTIs). Les FTIs inhibent la transformation cellulaire et la croissance tumorale dans de nombreux modèles murins et humains (Lebowitz et al., 1997 ; Du and Prendergast, 1999 ; Liu and Prendergast, 2000 ; Zeng et al., 2003). La diminution de la forme farnésylée de RhoB (RhoB-F) associée à une augmentation de la forme géranylgeranylée (RhoB-GG) serait à l'origine de l'effet anti-transformant des FTIs (Du and Prendergast, 1999). Ces résultats ont suggéré des rôles cellulaires antagonistes des deux formes de RhoB (Walker and Olson, 2005) : RhoB-F induirait la transformation cellulaire alors que RhoB-GG l'inhiberait (Du and Prendergast, 1999). Des travaux du laboratoire ont analysé la transformation de cellules NIH-3T3 induite par l'oncogène H-Ras après l'expression de mutants de RhoB dont le motif CAAX de prénylation ne peut qu'être soit farnésylé, soit géranylgeranylé. L'expression d'un mutant RhoB farnésylé potentialise la transformation cellulaire des cellules NIH-3T3 alors que l'expression d'un mutant RhoB géranylgeranylé l'inhibe (Mazieres et al., 2005). Néanmoins, l'importance de la forme géranylgeranylée de RhoB sur la transformation cellulaire reste à éclaircir. En effet, l'expression constitutive des formes aussi bien farnésylées que géranylgeranylées de RhoB dans différentes lignées tumorales humaines (adénocarcinome pancréatique, adénocarcinome pulmonaire, ostéosarcome...) inhibe la prolifération cellulaire et la capacité d'induire des tumeurs chez la souris (Chen et al, 2000 ; Mazieres et al, 2004).

Les résultats issus de souris knock-out (KO) pour RhoB supportent un rôle suppresseur de tumeurs de RhoB. Bien que les souris déficientes en RhoB se développent normalement, elles ont une susceptibilité accrue à former des tumeurs de peaux induites chimiquement par le carcinogène DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) (Liu et al., 2001b). De plus, des études montrent que RhoB inhibe la croissance des tumeurs et la formation de métastases chez la souris (Chen et al., 2000 ; Jiang et al., 2004 ; Couderc et al., 2008). Aussi, de nombreux oncogènes tels que H-Ras, N-Ras, K-Ras, EGFR et ErbB2 suppriment l'activité transcriptionnelle de *rhoB* dans les cellules NIH-3T3 et plusieurs lignées cancéreuses humaines (A-549, Panc-1, C33A) (Jiang et al., 2004).

Aucune altération du gène *rhoB* n'a été mise en évidence dans les différentes tumeurs humaines analysées (Adnane et al., 2002a ; Fritz et al., 2002 ; Sato et al., 2007).

L'équipe de Sato rapporte tout de même une perte d'hétérozygotie sur le locus de *rhoB* dans 25 sur 62 tumeurs examinées, mais la corrélation entre la perte d'hétérozygotie et la diminution de l'expression de RhoB dans ces tumeurs n'a pas été analysée (Sato et al., 2006). Toutefois, de nombreuses études soulignent une sous-expression de RhoB dans un certain nombre de cancers, notamment dans les cancers pulmonaires où cette perte d'expression est proportionnelle au stade d'avancement de la maladie (Mazieres et al., 2004 ; Sato et al., 2007), mais aussi dans les cancers de la sphère ORL (Adnane et al., 2002b), les glioblastomes (Forget et al., 2002) et les cancers gastriques (Zhou et al., 2011). Néanmoins, des résultats sur l'expression de RhoB dans les cancers mammaires divergent. Une étude rapporte que l'expression de RhoB est augmentée et corrélée avec la progression de la maladie (Fritz et al., 2002), alors qu'une étude récente du laboratoire montre que l'expression de RhoB est inversement corrélée avec le grade et la taille de la tumeur dans les cancers mammaires (Medale-Giamarchi et al., 2013).

Les mécanismes responsables de la diminution de l'expression de RhoB dans les tumeurs restent à éclaircir. Néanmoins, il apparaît que son expression serait réprimée, au niveau transcriptionnel, par l'histone déacétylase 1 (HDAC 1) dans des lignées tumorales pulmonaires humaines (Wang et al., 2003). De plus, il n'est pas exclu que la diminution de l'expression de RhoB observée dans les tumeurs, soit la conséquence de régulations post-transcriptionnelles. En effet, les miARN-21 et miARN-223 s'hybrident sur la région 3' non traduite de RhoB, inhibant ainsi sa traduction et donc son expression (Connolly et al., 2010 ; Sun et al., 2010).

Chapitre II : La cassure double-brin

II.1 Les différents types de dommages à l'ADN

L'ADN, support de notre information génétique, est constamment soumis à des stress endogènes et exogènes susceptibles de l'endommager (**figure 6**).

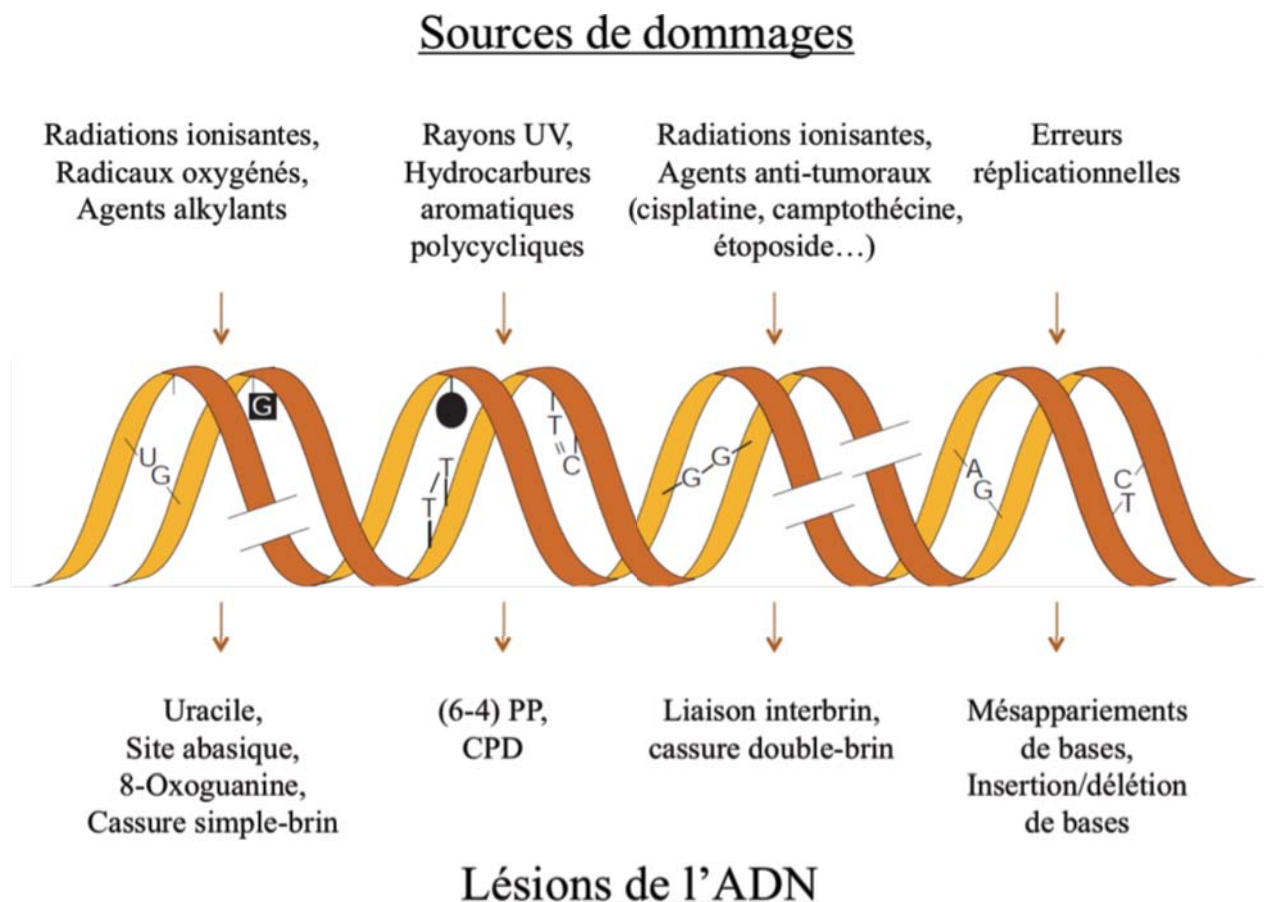


Figure 6 : Les différents types de dommages à l'ADN.

Exemples de lésions de l'ADN induits par des agents endogènes (métabolisme cellulaire...) ou exogènes (radiations ionisantes, rayons UV...).

(6-4) PP : 6-4 photoproducts ; CPD : cyclobutane pyrimidine dimer.

(Adapté de Hoeijmakers, 2001)

La cassure double brin (DSB) est considérée comme étant le type de lésion de l'ADN le plus cytotoxique. Les DSBs peuvent résulter de sources endogènes

(recombinaison V(D)J, méiose, métabolisme cellulaire) mais aussi de sources exogènes (radiations ionisantes, inhibiteurs de topoisomérases, radiomimétiques). Non ou mal réparées, les DSBs peuvent générer des translocations chromosomiques et une instabilité génomique avec les conséquences potentielles qui en découlent (initiation et/ou progression tumorale, malformations congénitales) (Jackson and Bartek, 2009).

Table 1 : Fréquences estimées du nombre de lésions de l'ADN physiologiques dans les cellules de mammifères.

TYPE DE DOMMAGE	NOMBRE D'ÉVÉNEMENTS PAR CELLULE ET PAR JOUR	REFERENCES
Lésions oxydatives de l'ADN	150000	(Barnes and Lindahl, 2004) ; (Beckman and Ames, 1997) ; (Lindahl, 1993) ; (Vilenchik and Knudson, 2003).
Dépurations hydrolytiques	2000-10000	
Déamination de la cytosine en uracile	100-500	
Méthylation-O ⁶ guanine	3100	
Oxydation -8 guanine	100-500	
Méthylation-3 guanine	600	
Hydroxyméthyluraciles	600	
Glycols thymine et thymidine	300	
Cassures simple-brin	5000	
Cassures double-brin	10-50	
Crosslinks interbrin	10	
Crosslinks ADN-protéine	non connu	

Tableau tiré du livre « DNA Topoisomerases and cancer » Yves Pommier, édition Humana Press

Suite à la présence de dommages à l'ADN, une réponse cellulaire est mise en place (encore appelée DDR pour DNA damage response). Dans un premier temps, un arrêt du cycle cellulaire est mis en place pour permettre de réparer les lésions. Si la cellule n'est pas capable de réparer correctement le dommage, elle met en place des mécanismes de mort cellulaire (apoptose, sénescence), empêchant ainsi la multiplication d'une cellule potentiellement dangereuse pour l'organisme (Stracker et al., 2013).

II.2 La détection du dommage et l'activation d'une réponse cellulaire

Les kinases ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related) et DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) sont des protéines de haut poids moléculaire (plus de 300 kDa) de la famille des kinases PIKKs (phosphatidylinositol-3 kinase-like protein kinases) qui initient la réponse aux dommages à l'ADN (Woods and Turchi, 2013).

II.2.1 Activation d'ATM en réponse aux dommages à l'ADN

Les DSBs sont reconnus par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). La liaison du complexe MRN aux extrémités d'ADN au site de la DSB entraîne une activation rapide de la kinase ATM (Stracker and Petrini, 2011). ATM est la principale kinase activée en réponse aux DSBs (Shiloh, 2006 ; Shiloh and Ziv, 2013). Des mutations homozygotes du gène ATM sont responsables du syndrome d'ataxie télangiectasie (AT). Ce syndrome se manifeste par une ataxie cérébelleuse de pronostic sévère et précoce, des télangiectasies oculo-cutanées, une immunodéficience majeure, des remaniements chromosomiques spontanés et une prédisposition à de nombreux cancers (essentiellement leucémies et lymphomes). Les cellules de patients A-T présentent une instabilité chromosomique ainsi qu'une sensibilité accrue aux agents qui induisent des DSBs (Kuhne et al., 2004).

En absence de dommage, ATM est présent sous forme de dimères ou multimères inactifs (Bakkenist and Kastan, 2003). Après reconnaissance de la DSB par le complexe MRN, ATM subit des autophosphorylations sur au moins quatre sites (S367, S1893, S1981, S2996), ce qui favorise sa monomérisation et son activité kinase (Bakkenist and Kastan, 2003 ; Kozlov et al., 2006).

Des études révèlent que les phosphatases PP2A, PP5 et Wip1 régulent l'activité d'ATM. L'utilisation de l'acide okadaïque à des concentrations qui inhibent spécifiquement l'activité de PP2A *in vitro*, induit une autophosphorylation d'ATM en Ser1981. A l'état de base, ATM co-immunoprécipite avec la phosphatase PP2A, et cette interaction est abolie en réponse à des radiations ionisantes, ce qui permettrait l'autophosphorylation d'ATM (Goodarzi et al., 2004). PP5 co-immunoprécipite avec ATM, mais contrairement à PP2A, cette interaction augmente après l'exposition des

cellules aux radiations ionisantes. Aussi, la déplétion de PP5 par siRNA entraîne un défaut d'activation d'ATM (Ali et al., 2004). ATM est acétylée par le complexe Tip60 après dommages à l'ADN et la déplétion de Tip60 par siRNA entraîne un défaut d'autophosphorylation d'ATM, suggérant que l'activité de Tip60 est requise pour l'activité d'ATM (Sun et al., 2005). De même, une autre étude montre que hMOF, une HAT responsable de l'acétylation de l'histone H4, interagit avec ATM et que l'autophosphorylation d'ATM serait dépendante de l'activité acétylase de hMOF (Gupta et al., 2005).

II.2.2 Activation d'ATR en réponse aux dommages à l'ADN

La kinase ATR répond principalement au stress réplicatif engendré par un blocage de la progression de la fourche de réplication par (1) la présence de dommages à l'ADN, (2) un manque de déoxynucléotides ou encore (3) une difficulté à répliquer des séquences d'ADN (Nam and Cortez, 2011). Un défaut de résolution de ces fourches de réplication bloquées entraîne la formation d'intermédiaires de réplication sous forme d'ADN simple brin mais aussi la formation de DSBs (Nam and Cortez, 2011).

Des mutations de perte de fonction homozygotes d'ATR ne sont pas compatibles avec la viabilité cellulaire chez les mammifères (de Klein et al., 2000). Cependant, des mutations hypomorphiques d'ATR qui causent une réduction de la fonction d'ATR sont trouvées chez des patients atteints du syndrome de Seckel, caractérisé par une microcéphalie ainsi qu'un retard de croissance (O'Driscoll et al., 2003 ; Rass et al., 2007).

ATR est activée par l'ADN simple brin produit principalement au niveau de fourches de réplication bloquées, mais aussi lors de la résection des DSBs lors de la réparation par recombinaison homologue (Cimprich and Cortez, 2008). En conséquence, l'activation d'ATR est restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire, la recombinaison homologue étant absente en G1 (Cuadrado et al., 2006 ; Jazayeri et al., 2006) (**voir paragraphe réparation des cassures double-brin**).

La **figure 7** propose un modèle résumant les étapes de l'activation d'ATR. L'ADN simple brin (ssDNA) est rapidement recouvert de protéines RPA (Replication Protein A). Par la suite, ATR est recrutée au site de la lésion via son partenaire ATRIP (ATR-interacting protein). En parallèle, le recrutement de l'hétérotrimère 9-1-1 (Rad9-Rad1-

Hus1) est essentiel pour recruter TopBP1 (topoisomerase-binding protein 1), qui favorise l'activation d'ATR. Une fois activée, ATR phosphoryle ces substrats (Nam and Cortez, 2011).

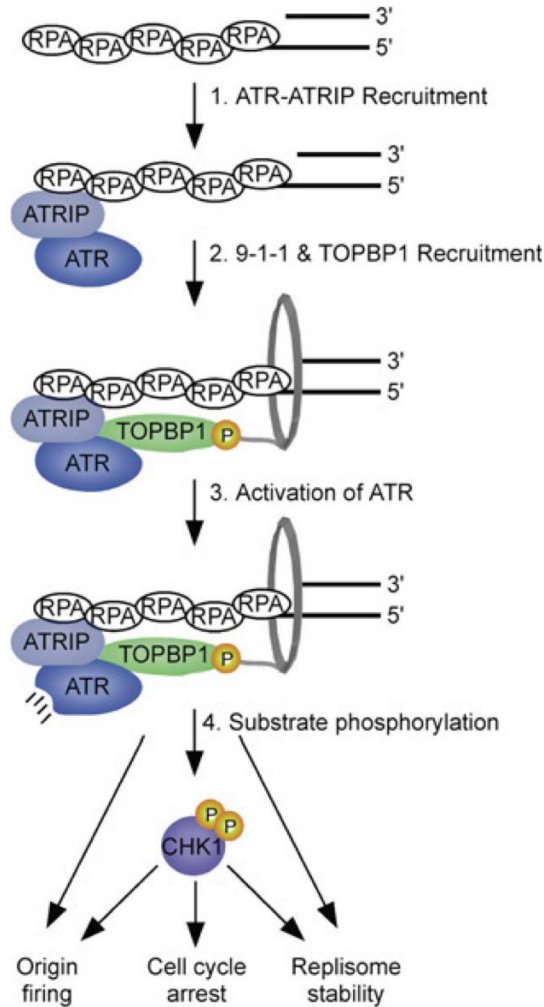


Figure 7 : Activation de la kinase ATR.

La présence d'ADN simple brin est le signal commun qui initie une réponse dépendante d'ATR. Via le recrutement de plusieurs protéines, l'activation de la kinase ATR entraîne la phosphorylation de ces nombreux substrats dont Chk1 afin de réguler les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN et au stress réplcatif.

(D'après Nam and Cortez, 2011)

Actuellement, La meilleure mesure de l'activation d'ATR est la mesure de la phosphorylation de son principal effecteur Chk1 sur les sérines 317 et 345 (Liu et al., 2000 ; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Récemment, un site d'autophosphorylation d'ATR en Thr1989 a été caractérisé comme étant un marqueur potentiel d'activation d'ATR (Nam et al., 2011).

II.2.3 Activation de DNA-PK en réponse aux dommages à l'ADN

DNA-PK est une holoenzyme composée de la sous-unité catalytique DNA-PKcs et de l'hétérodimère Ku70-Ku80 (Pawelczak et al., 2011). La kinase DNA-PKcs est activée en réponse aux DSBs et joue un rôle majeur dans la réparation des DSBs. Des souris knock-out pour DNA-PKcs sont viables mais immunodéficientes et des cellules déficientes en DNA-PKcs sont radiosensibles et présentent des défauts de réparation des DSBs (Bogue et al, 1998).

En réponse à une DSB, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se lie aux deux extrémités de la DSB et recrute DNA-PKcs de part et d'autre de la cassure (Pawelczak et al., 2011). Les molécules de DNA-PKcs dimérisent et interagissent à travers les terminaisons de l'ADN formant un complexe synaptique. DNA-PK subit alors une trans-autophosphorylation sur plus de 40 sites (Dobbs et al., 2008). L'activation de DNA-PKcs est considérablement affectée par la structure de l'ADN auquel se lie la kinase. De nombreuses études ont montré que les extrémités chevauchantes de l'ADN (en 5' ou en 3') sont des activateurs plus robustes de DNA-PK que les extrémités franches de l'ADN (Jovanovic and Dynan, 2006).

Les kinases ATM et ATR transduisent le signal des dommages via les kinases effectrices Chk2 et Chk1 respectivement, qui maintiennent et amplifient la réponse aux dommages à l'ADN (Bartek and Lukas, 2003) (cf § II.4 : La transduction du signal cellulaire aux dommages par les checkpoints).

II.3 Organisation de la réponse aux dommages aux sites des cassures

Les kinases ATM, ATR et DNA-PK phosphorylent de nombreuses protéines de la réponse aux dommages à l'ADN aux sites des cassures comme par exemple l'histone H2AX (cf § II.3.1 : La phosphorylation de l'histone H2AX) et la protéine Chk2 (cf § II.4.1 La protéine Chk2).

II.3.1 La phosphorylation de l'histone H2AX

H2AX, un variant de l'histone H2A de 143 acides aminés, représente 2 à 25% des histones H2A chez les mammifères, en fonction de l'organisme et du type cellulaire (Rogakou et al., 1998 ; Redon et al., 2002). Comme les autres protéines d'histone, H2AX est composé d'un domaine globulaire central et d'extrémités N- et C-terminales qui possèdent des sites de modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la biotinylation, la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination (Cheung et al., 2000 ; Chew et al., 2006 ; Goll and Bestor, 2002 ; Rogakou et al., 1998) (**figure 8**).

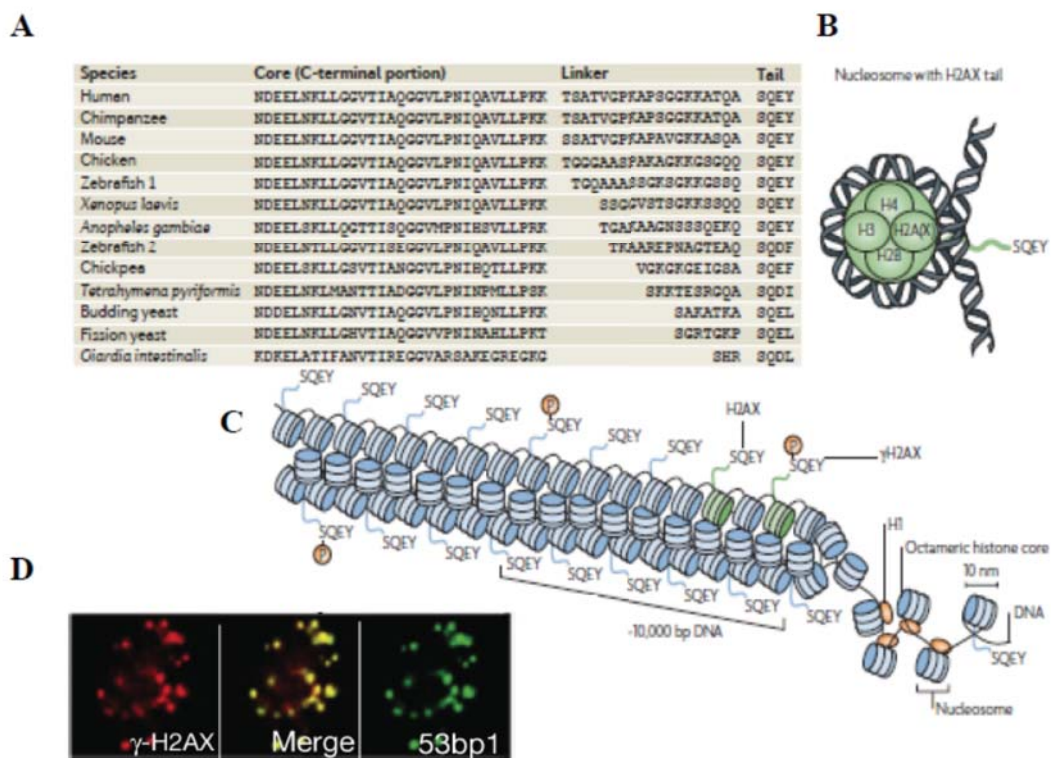


Figure 8 : L'histone H2AX et le foyer γ -H2AX.

A- H2AX est une histone H2A avec une séquence « core » et un motif SQEY conservé à travers l'évolution connecté à un « linker » d'une séquence variable. Le motif conservé SQEY contient la sérine omega-4 qui est phosphorylée après formation d'une cassure double-brin de l'ADN **B-** L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, constitué par l'enroulement de 147 paires de bases d'ADN autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). Le motif SQEY s'étend du nucléosome près du point d'entrée-sortie de l'ADN. **C-** Les nucléosomes forment une fibre de 30 nm composée de protéines H2AX en moyenne tous les 5 nucléosomes chez les mammifères et dans chaque nucléosome chez la levure. Près de 10% des protéines H2AX sont phosphorylées à un moment donné dans un foyer γ -H2AX. **D-** Analyse par microscopie à fluorescence des foyers nucléaires γ -H2AX

(rouge) et 53BP1 (vert) dans des fibroblastes humains exposés à 1 Gy d'irradiation pendant 30 minutes. Colocalisation des foyers γ H2AX et 53BP1 en jaune.

(Adapté de Bonner et al., 2008 et Sedelnikova et al., 2004)

Suite à l'induction d'une DSB, l'histone H2AX est rapidement phosphorylée en C-terminal en sérine 139 chez l'humain (Fernandez-Capetillo et al., 2004 ; Rogakou et al., 1998). La phosphorylation de H2AX en sérine 139 (nommée γ -H2AX) est catalysée par les membres de la famille des kinases PI3K tels que ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (AT and Rad3-related protein), et DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Fernandez-Capetillo et al., 2004 ; Stiff et al., 2004 ; Stiff et al., 2006). Le résidu tyrosine en C-terminal de H2AX (Y142) peut aussi être phosphorylé par WSTF (Cook et al., 2009). La phosphorylation en Y142 est constitutive et ce résidu est déphosphorylé après dommages à l'ADN par les phosphatases EYA1 et EYA3, ce qui semble nécessaire à l'induction de γ -H2AX (Cook et al., 2009).

La phosphorylation de H2AX peut se propager sur plusieurs mégabases de part et d'autre de la cassure, permettant une amplification de la cascade de signalisation en réponse aux dommages (**figure 9**) (Pilch et al., 2003 ; Rogakou et al., 1999 ; Iacovoni et al., 2010). Cette réponse amplifiée est facilement détectable en immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre γ H2AX, sous forme de foyers nucléaires (**figure 8D**) (Sedelnikova et al., 2003). Le nombre de foyer γ -H2AX formé par noyau reflète le nombre de DSBs (Rogakou et al., 1999 ; Rothkamm and Lobrich, 2003), suggérant que chaque foyer γ H2AX correspond au moins à une DSB.

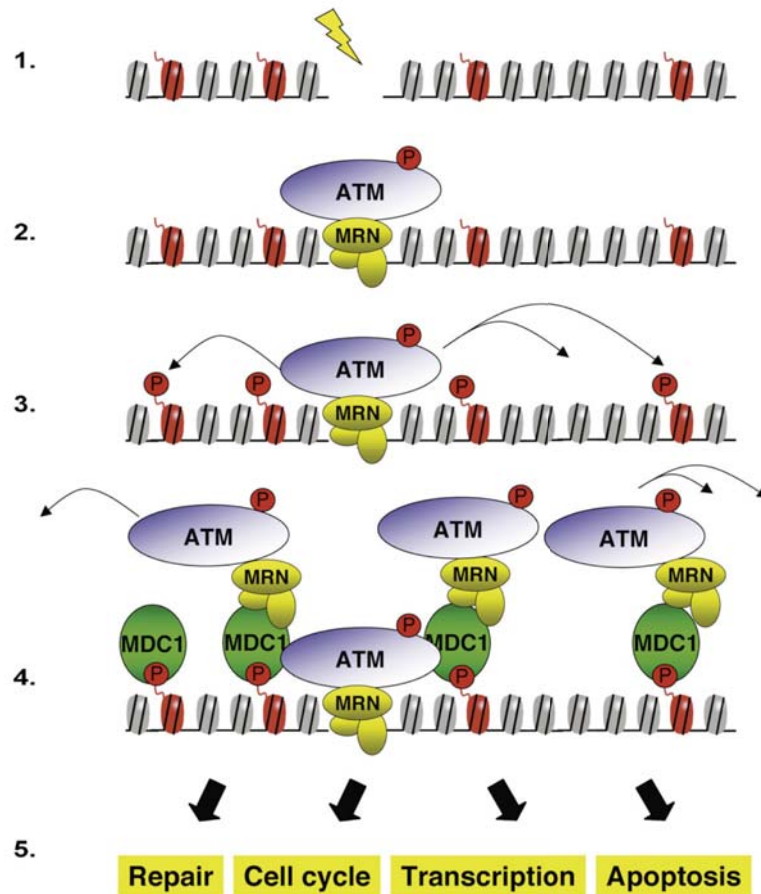


Figure 9 : La formation de γ -H2AX entraîne une cascade d'amplification de la signalisation des dommages à l'ADN.

1- Induction d'une DSB. **2-** L'ADN clivé est détecté par le complexe MRN, qui recrute ATM au site de la DSB. Le recrutement d'ATM par le complexe MRN entraîne l'autophosphorylation d'ATM en S1981. **3-** ATM phosphoryle l'histone H2AX en sérine 139, nommée γ H2AX. **4-** La phosphorylation de H2AX sert d'amarrage pour le recrutement du médiateur MDC1 sur la chromatine, entraînant une amplification de la cascade de signalisation. **5-** Le signal de la réponse aux dommages à l'ADN est transmis aux kinases effectrices qui permettront l'activation des checkpoints, la réparation de la lésion ou la mort cellulaire.

(D'après Valdiglesias et al., 2013)

γ -H2AX joue un rôle important dans le recrutement et l'accumulation des protéines aux sites des DSBs (Fernandez-Capetillo et al., 2003 ; Fillingham et al., 2006 ; Paull et al., 2000). Ces protéines incluent 53BP1, BRCA1, RNF8, le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) qui colocalisent avec les foyers γ -H2AX. Des MEFs issus de souris déficientes en H2AX présentent une instabilité génomique et un défaut

d'accumulation des protéines de la réparation de l'ADN aux sites des cassures (Celeste et al., 2002).

II.4 La transduction du signal cellulaire aux dommages par les checkpoints

En réponse aux dommages, les kinases checkpoints Chk1 et Chk2 diffusent dans le noyau et phosphorylent un bon nombre de substrats en commun tels que p53, Cdc25A et Cdc25C, ce qui fait qu'elles ont des rôles redondants notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Bartek and Lukas, 2003). Cependant, des différences existent entre Chk1 et Chk2. Les souris knock out pour Chk2 sont viables alors que le knock out pour Chk1 est létal au stade embryonnaire (Liu et al., 2000, Takai et al., 2000). Chk2 est activée principalement par ATM en réponse aux DSBs alors que Chk1 est principalement activée par ATR en réponse aux dommages réplicationnels (Smith et al., 2010). Cependant, des « cross-talks » existent étant donné que ATM peut aussi phosphoryler Chk1 en réponse aux radiations ionisantes (Gatei et al., 2003 ; Sorensen et al., 2003) et que ATR peut phosphoryler Chk2 (Matsuoka et al., 2000). Aussi, Chk2 est une protéine stable exprimée tout au long du cycle cellulaire alors que Chk1 est une protéine labile restreinte aux phases S et G2 (Lukas et al., 2001). De bonnes revues décrivent la kinase Chk1, la régulation de son activité ainsi que ses substrats (Smith et al., 2010 ; (Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo, 2010). Pour la compréhension de mon sujet et la clarté du manuscrit, je ne décrirai que la kinase Chk2.

II.4.1 La protéine Checkpoint kinase 2 (Chk2)

II.4.1.1 Activation de Chk2 en réponse aux dommages à l'ADN

La protéine Chk2 de 543 acides aminés est composée de trois domaines fonctionnels distincts (**figure 10**) :

- un domaine SCD (SQ/TQ cluster domain) en N-terminal
- un domaine central FHA (forkhead associated domain)
- et un domaine Ser/Thr kinase en C-terminal qui contient la boucle T d'activation

En réponse aux DSBs, Chk2 est principalement activée par ATM. En effet, Chk2 n'est pas activée dans les cellules A-T (ataxia telangiectasia) déficientes en ATM en réponse aux radiations ionisantes (Matsuoka et al., 1998). *In vitro*, ATM phosphoryle Chk2 en Thr68 dans le domaine SCD (SQ/TQ cluster domain) et la mutation en alanine (T68A) empêche l'activation de Chk2 par les radiations ionisantes *in vivo* (Ahn et al., 2000 ; Matsuoka et al., 2000). La kinase ATR phosphoryle Chk2 en Thr68 notamment en réponse aux radiations ultraviolettes et à l'hydroxyurée (Matsuoka et al., 2000). DNA-PKcs peut aussi phosphoryler Chk2 (Li and Stern, 2005 ; McSherry and Mueller, 2004).

Dans les conditions physiologiques, Chk2 est présent sous forme de monomères inactifs. En réponse aux DSBs, la phosphorylation de Chk2 en Thr68 (Matsuoka et al., 2000 ; Ahn et al., 2000 ; Melchionna et al., 2000) entraîne sa dimérisation où le domaine FHA (forkhead-associated domain) d'une protéine Chk2 se lie à la Thr68 phosphorylée d'une autre protéine Chk2 (Ahn and Prives, 2002). La dimérisation est ensuite suivie par des trans-phosphorylations intermoléculaires de Chk2 en Thr383 et en Thr387 sur la boucle d'activation du domaine kinase (Lee and Chung, 2001) et en cis-phosphorylation en S516. Ces phosphorylations sont requises pour une activité kinase complète de Chk2 envers ses substrats. La mutation I157T dans le domaine FHA de Chk2 (mutation germinale dans les syndromes Li-Fraumeni sans p53) empêche la dimérisation et l'activation de Chk2 (Schwarz et al., 2003).

Par des approches *in vitro* et *in vivo*, il a été mis en évidence un rôle fonctionnel de Plk3 (Polo-like kinase 3) dans la régulation de Chk2. La phosphorylation de Chk2 en S73 par Plk3 facilite la phosphorylation de Chk2 en Thr68 par ATM. En effet, la mutation de la S73 en alanine (Chk2 S73A) réduit l'efficacité de phosphorylation de la Thr68 par ATM en réponse aux dommages à l'ADN (Bahassi el et al., 2006).

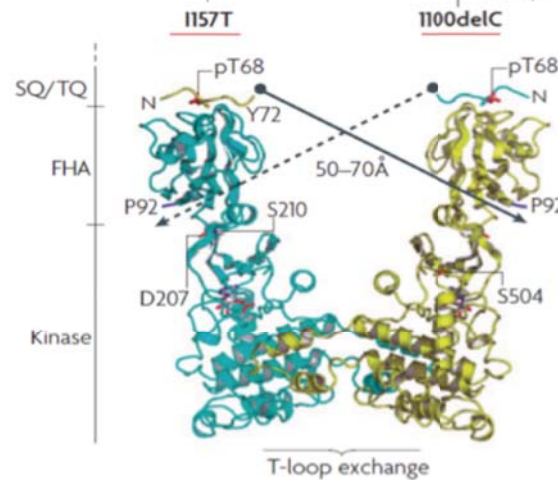
A**B**

Figure 10 : Structure et activation de la protéine Chk2.

A- La protéine Chk2 de 543 acides aminés est composée d'un domaine cluster SQ/TQ (SCD), d'un domaine FHA (forkhead associated domain) et d'un domaine kinase en C-terminal qui contient la boucle T d'activation. Les sites de phosphorylation de Chk2 en réponse aux dommages à l'ADN sont présentés au dessus du schéma. Les principaux résidus phosphorylés pour réguler la fonction de Chk2 sont en gras. Les principales mutations de Chk2 détectées dans les tumeurs humaines sont soulignées en rouge.

B- Modèle schématique d'un dimère de Chk2. Ce modèle présente l'arrangement dimérique de Chk2, qui permet l'échange de boucles T et propose un mécanisme par lequel la dimérisation active Chk2 par des événements de trans-phosphorylations.

(D'après Antoni et al., 2007)

II.4.1.2 Les substrats de Chk2

Une fois activée, Chk2 phosphoryle un nombre limité de substrats (**table 2**), tels que des protéines régulatrices du cycle cellulaire (Cdc25A et Cdc25C), des facteurs de transcription (E2F-1, p53) ou encore des suppresseurs de tumeurs (Brca1, PML), impliquant Chk2 dans les processus d'arrêt de la croissance cellulaire, d'apoptose et de réparation de l'ADN (Bartek and Lukas, 2003 ; Stolz et al., 2010). Dans les paragraphes qui suivent nous allons nous intéresser à HuR, une protéine de liaison aux ARN

messagers, décrite comme étant un substrat de Chk2 (Abdelmohsen et al., 2007b ; Liu et al., 2009).

Récemment, une étude a mis en évidence un rôle de Chk2 dans l'épissage des pré-ARN messagers. La kinase CDK11^{p110} impliquée dans la transcription et l'épissage des pré-ARN messagers a été décrite comme étant une cible de Chk2. En effet, CDK11^{p110} est phosphorylée en S737 par Chk2 de façon constitutive indépendamment des dommages à l'ADN. La mutation de la S737 en alanine de CDK11^{p110} (CDK11^{p110} S737A) abolie son activité d'épissage *in vivo* (Choi et al., 2012).

Table 2 : Les substrats de Chk2.

Substrats de Chk2	Sites de phosphorylation	Conséquences	Références
p53	S20	Apoptose	(Shieh et al., 2000)
E2F1	S364	Apoptose	(Stevens et al., 2003)
BRCA1	S988	Réparation de l'ADN	(Lee et al., 2000)
PML	S117	Apoptose	(Yang et al., 2002)
Cdc25A	S123	Arrêt du cycle cellulaire en G1	(Falck et al., 2001)
Cdc25C	S216	Arrêt du cycle cellulaire en G2	(Blasina et al., 1999)
PP2A	Sous-unité B'gamma 3	Régulation de Chk2	(Dozier et al., 2004)
HuR	S88, S100 et T118	Régulation de la stabilité des ARNm cibles de HuR	(O'Neill et al., 2002)
pVHL	S111	Régulation de la transactivation de p53	(Roe et al., 2011)
CDK11 ^{p110}	S737	Activité d'épissage des ARNm	(Choi et al., 2012)
Survivin-ΔEx3	T127, T79 et S98	Senseur des dommages non réparés	(Lopergolo et al., 2012)

II.4.1.2.1 La protéine HuR

II.4.1.2.1.1 Structure et fonctions de HuR

HuR (Hu antigen R) ou encore ElaV-Like 1 (Embryonic Lethal Abnormal Vision 1) appartient à la famille des protéines Hu, composée de trois autres membres : HuB, HuC, et HuD. HuR a une expression ubiquitaire, alors que les autres membres de cette

famille sont plutôt exprimés dans le tissu nerveux (Good, 1995). HuR est une protéine de 36 kDa qui contient trois domaines de liaison à l'ARNm (RRM, RNA Recognition Motif) et un domaine Hinge ou HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence) situé entre les domaines RRM2 et RRM3 (**figure 11**).

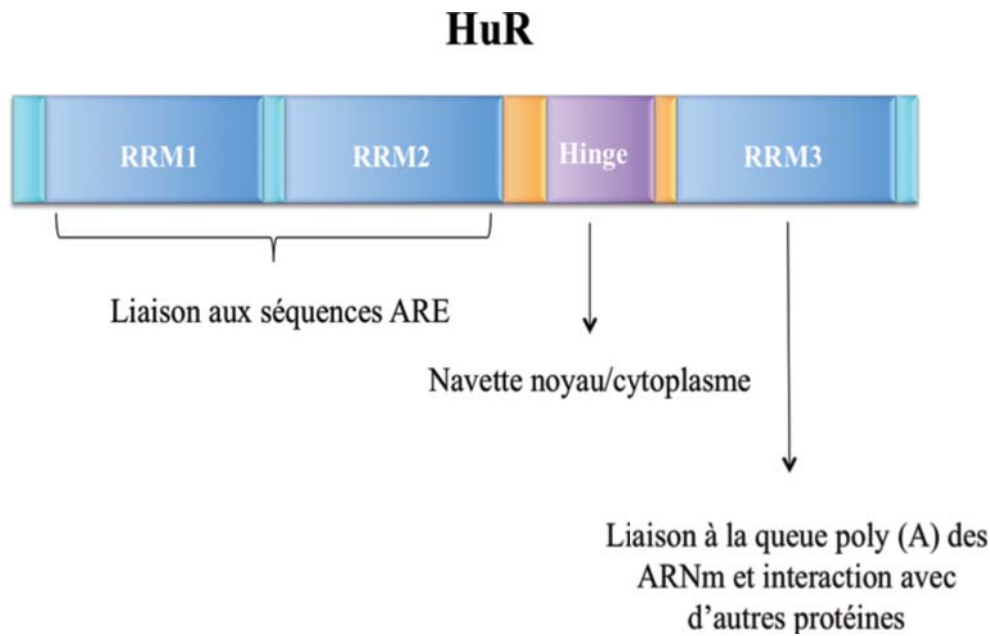


Figure 11 : Représentation schématique de la protéine HuR.

HuR possède trois domaines RRM (RNA recognition motifs). Les domaines RRM1 et RRM2 se lient aux séquences AREs (AU-rich element) des ARNm. Le domaine RRM3 se lie à la queue poly (A) des ARNm et permet à HuR d'interagir avec d'autres protéines. La région « Hinge » contient les domaines de localisation nucléaire et d'export nucléaire.

(Adapté de Hinman and Lou, 2008)

Bien que HuR soit majoritairement nucléaire, sa translocation au cytoplasme a été reliée à sa capacité à stabiliser ou à moduler le niveau de traduction de ses ARNm cibles (Brennan and Steitz, 2001). Dans le cytoplasme, la fonction la plus connue de HuR est la régulation de la stabilité des ARNm (Brennan and Steitz, 2001). En se liant sur des séquences ARE (AU-Rich Element), présentes le plus souvent en 3'UTR des ARNm (Barreau et al., 2005), HuR empêche la dégradation des ARNm, augmentant ainsi indirectement la production de la protéine. HuR régule ainsi positivement la traduction de plusieurs ARNm, comme par exemple p53 (Mazan-Mamczarz et al., 2003), le cytochrome c (Kawai et al., 2006) ou encore HIF1 alpha (hypoxia-inducible factor 1 alpha) (Galban et

al., 2008). Dans d'autres circonstances, HuR peut aussi réprimer la traduction de certains ARNm, tels que ceux de p27 (Kullmann et al., 2002) ou encore d'IGF-IR (Meng et al., 2005).

Les fonctions nucléaires (**figure 12**) de HuR sont moins bien connues. Certaines études suggèrent que HuR pourrait jouer un rôle dans la polyadénylation des ARNm ainsi que dans leur transport nucléocytoplasmique (Zhu et al., 2007 ; Prechtel et al., 2006).

De part les fonctions des protéines codées par les ARNm régulés par HuR, elle a été impliquée dans les processus de carcinogenèse (Lopez de Silanes et al., 2003), de prolifération, de différenciation (van der Giessen et al., 2003) et dans la réponse aux dommages génotoxiques (Gorospe, 2003).

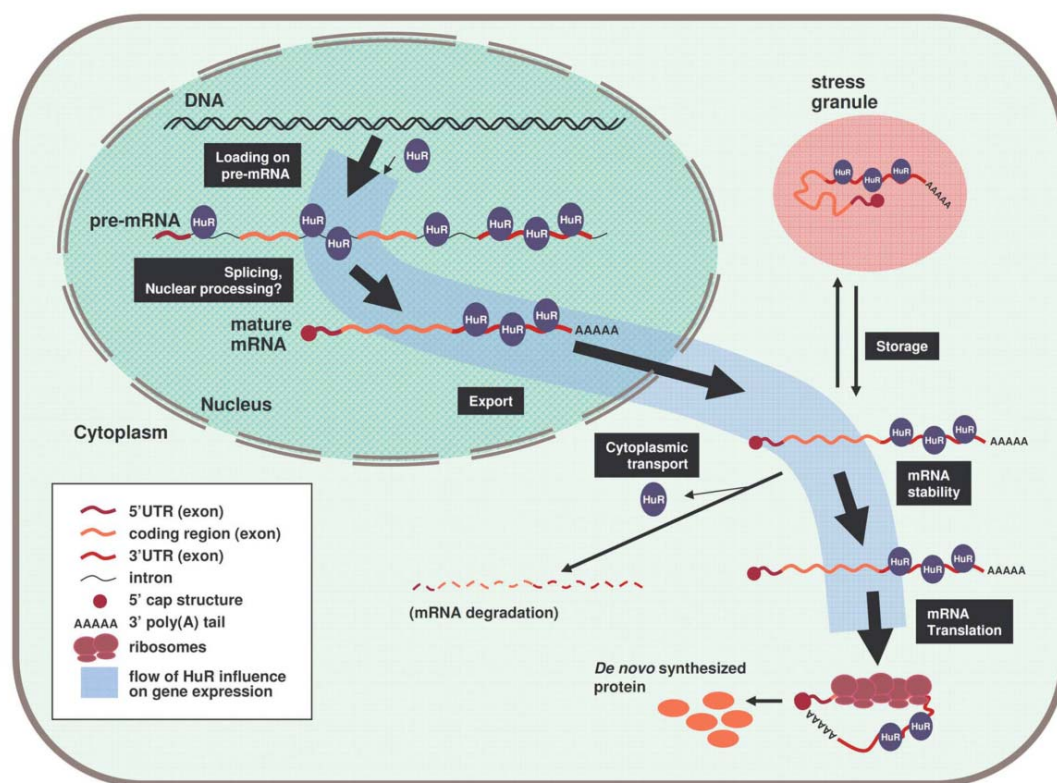


Figure 12 : Fonctions nucléaires et cytoplasmiques de HuR.

Dans le noyau, HuR s'associe aux pré-ARNm et affecte son épissage et probablement d'autres « processing » nucléaires. HuR assiste ensuite à l'export de l'ARNm mature. Dans le cytoplasme, HuR stabilise l'ARNm, pourrait jouer un rôle dans le stockage transitoire de l'ARNm (comme dans les granules de stress), et module le recrutement de l'ARNm dans la machinerie de traduction (polysomes)

(adapté de Srikantan and Gorospe, 2011).

HuR cible des ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, tels que les suppresseurs de tumeurs (p53, pVHL), des inhibiteurs de cdk (cyclin-dependent kinase) (p21,p27), des facteurs anti-apoptotiques (ProTα, Bcl-2 et Mcl-1) et des molécules de signalisation comme la phosphatase MAP kinase MKP-1 (Kim et al., 2010b) (**table 3**).

Table 3 : Liste partielle des ARNm cibles de HuR codant des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.

	ARNm cible de HuR après dommages à l'ADN	Région de liaison	Type de dommage affectant la régulation de HuR	Kinase de HuR	Références
Stabilisation de l'ARNm	c-fos p21 cycline A2 cycline B1 cycline D1 iNOS VEGF SIRT1 TNF-α bcl-2 mcl-1 COX-2 uPA uPAR IL-3 MKP-1	3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR	n.r UVC, RI H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ UVC n.r n.r H ₂ O ₂ n.r n.r n.r n.r n.r n.r n.r H ₂ O ₂	n.r Chk2, p38 Chk2, Cdk1 n.r Chk2 n.r n.r Chk2 n.r Cdk1 Cdk1 PKC, p38 n.r n.r n.r Cdk1	[-] [1, 2] [1, 3] [4] [1] [-] [-] [1] [-] [5] [5] [6, 7] [-] [-] [-] [8]
↑ Traduction	p53 ProTα cytochrome c MKP-1 HIF-1α	3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR	UVC UVC n.r H ₂ O ₂ n.r	n.r Chk2, Cdk1 Chk2 Cdk1 Cdk1	[-] [3] [1] [3] [3]
↓ Traduction	p27 IGF-IR Wnt5a HuR c-Myc	5'UTR 5'UTR 3'UTR 3'UTR 3'UTR	n.r n.r n.r n.r n.r	n.r n.r n.r n.r n.r	[-] [-] [-] [-] [-]

n.r : non reporté. RI : radiations ionisantes. UVC : ultraviolets de type C. [1] : (Abdelmohsen et al., 2007b) ; [2] : (Basu, 2003) ; [3] : (Kim et al., 2008a) ; [4] : (Kim et al., 2008b) ; [5] : (Abdelmohsen et al., 2007a) ; [6] : (Doller et al., 2007) ; [7] : (Subbaramaiah et al., 2003) ; [8] : (Kuwano et al., 2008). (Table adaptée de Kim et al, 2010). (Tableau adapté de Kim et al., 2010b)

De manière générale, les changements de fonctions de HuR repose sur deux étapes : (1) la localisation subcellulaire de HuR et, (2) l'interaction de HuR avec les ARNm cibles. La phosphorylation de HuR par de nombreuses kinases régulées par les dommages à l'ADN incluant PKC α , PKC δ , Cdk1, p38^{MAPK} et Chk2 module la localisation subcellulaire de HuR ainsi que l'association de HuR avec ses ARNm cibles (Abdelmohsen et al., 2007b ; Doller et al., 2007 ; Doller et al., 2008 ; Kim et al., 2008b) ; Lafarga et al., 2009) (**figure 13**).

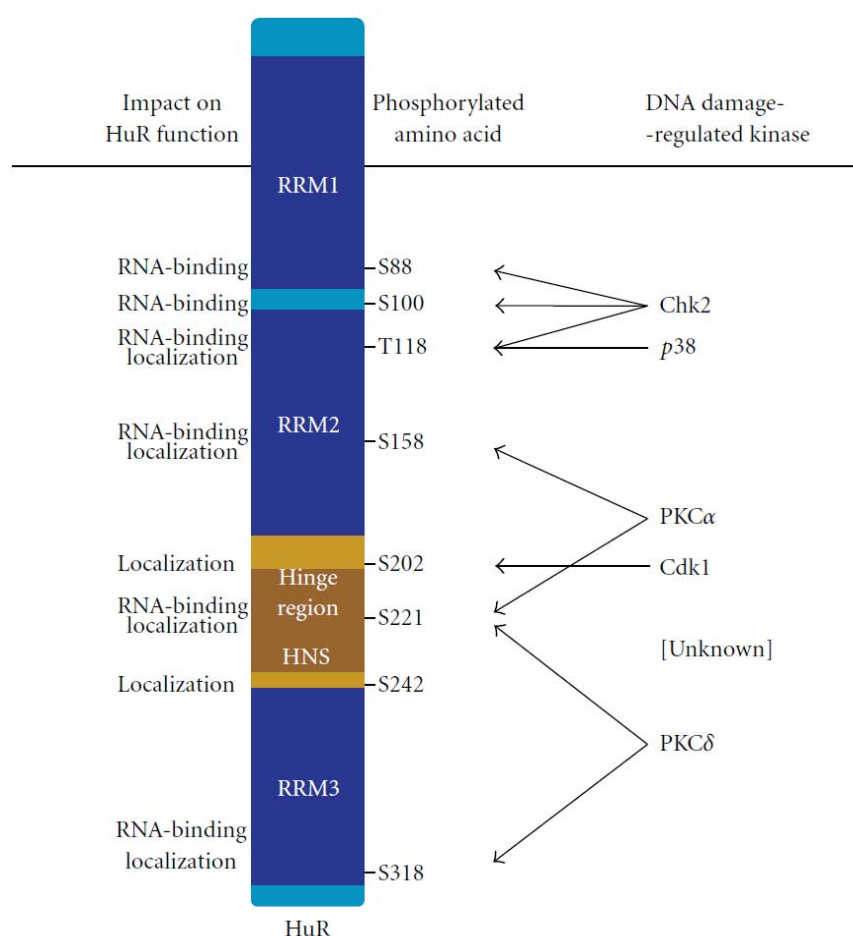


Figure 13 : Sites de phosphorylation de HuR par les kinases induites en réponse aux dommages à l'ADN.

Représentation schématique de la protéine HuR représentant les motifs de reconnaissance de l'ARN (RRMs), la région « hinge » qui contient la séquence HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling) qui permet à HuR de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, les sites de phosphorylation de HuR, et les kinases régulées par les dommages à l'ADN, incluant une kinase encore non identifiée prédite pour phosphoryler HuR en S242. Les conséquences de la phosphorylation de HuR aux différents sites sont indiquées à gauche (D'après Kim et al., 2010b).

II.4.1.2.1.2 Régulation de HuR par Chk2

HuR a été décrite comme pouvant être phosphorylé par la kinase Chk2 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cette modification post-traductionnelle de HuR module la capacité de liaison de HuR à ses ARNm cibles (Abdelmohsen et al., 2007b ; Liu et al., 2009). L'activation de Chk2 en réponse à un stress oxydatif (H₂O₂) entraîne une dissociation du complexe HuR-ARNm SIRT1 (Abdelmohsen et al., 2007b). Trois sites putatifs de phosphorylation de HuR par Chk2 ont été identifiés : les résidus en S88, S100 et T118 (O'Neill et al., 2002). La mutation en S100 en résidu non phosphorylable (S100A) permet l'association de l'ARNm SIRT1 avec HuR après dommage oxydatif, ce qui indique que la phosphorylation en S100 est critique pour la dissociation de l'ARNm. De manière intéressante, la mutation en T118 en un site non phosphorylable (T118A) montre généralement une réduction de la liaison de tous les ARNm cibles, suggérant que la phosphorylation en T118 augmente la liaison de HuR aux ARNm cibles (Abdelmohsen et al., 2007b).

Des études de microarrays ont comparé l'association de HuR avec des ARNm cibles entre des cellules HCT116 Chk2WT versus KO pour Chk2 suite à un traitement par des radiations ionisantes. Les résultats ont montré une dissociation de HuR de la plupart de ses ARNm cibles dans les cellules WT alors que HuR reste liée à ses ARNm cibles dans les cellules KO pour Chk2 (Masuda et al., 2011). De plus, cette étude montre que cette dissociation des complexes HuR-ARNm dans les cellules Chk2 WT après traitement par des radiations ionisantes favorise la survie cellulaire.

D'autres études sont requises afin d'élucider si d'autres agents génotoxiques jouent sur Chk2 pour phosphoryler HuR et comprendre comment ces modifications affectent la fonction de HuR. Aussi, il serait intéressant d'examiner comment d'autres ARNm cibles de HuR sont régulés après la phosphorylation de HuR par Chk2.

Chk2 est mutée dans le syndrome Li-Fraumeni et dans de nombreux types de cancers (Bell et al., 1999 ; Vahteristo et al., 2002) ; ces mutations modifient la capacité qu'a Chk2 d'interagir avec ces substrats, l'activité kinase de Chk2 ainsi que la localisation subcellulaire de Chk2 (Zhou and Elledge, 2000 ; Wu et al., 2001). Etant donné que Chk2

phosphoryle HuR et que les mutations de Chk2 influencent sa fonction, il sera important d'étudier en détail l'influence de Chk2 sur la fonction de HuR sur ces ARNm cibles.

II.5 La déphosphorylation des protéines de la réponse aux dommages

Les phosphorylations des protéines de la réponse aux dommages sont réversibles et prises en charge par des sérine/thréonine phosphatases comme PP2A, PP4, PP1, PP6 et Wip1 (**table 4**) (Freeman and Monteiro, 2010). De nombreuses études récentes soulignent l'importance de déphosphoryler correctement dans le temps les protéines de la réponse aux dommages pour permettre une réparation efficace (Chowdhury et al., 2005 ; Wang et al., 2009). La **table 5** présente les kinases et phosphatases qui régulent les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN. Pour la clarté du manuscrit, je ne décrirai que la déphosphorylation de γ -H2AX.

Table 4 : Les phosphatases sérine/thréonine.

Phosphatases Ser/Thr		Sous-unité catalytique	Sous-unité régulatrice
PPP	PP1	C (α , β , γ)	Les protéines interagissant avec PP1 (PIPs, plus de 90)
	PP2A	C (α , β)	Sous-unité A (α , β), sous-unité B (PR55, PR61, PR72)
	PP4	C	PP4R1, PP4R2, PP4R3 α , PP4R3 β , PP4R4
	PP5	C	aucune
	PP6	C	PP6R1, PP6R2, PP6R3
	PP7	C	non connue
	PP2B	PP3C (α , β , γ)	Calcineurine B ou CNB
PPM	PP2C	PP2C (α , β , γ , δ , ϵ , ξ , η , κ), CaMKP, CaMKP-N, ILKAP, PHLPP, NERRP-2C, TA-PP2C, PDP1, PDP2	Aucune

Les protéines phosphatases sont classées en trois groupes : les phosphatases sérine/thréonine (PPP et PPM) présentées dans le tableau, les phosphatases tyrosine (PTP) et les phosphatases HAD (haloacid dehalogenase). Les phosphatases PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6 et WIP1 (nommée aussi PP2C δ ou PPMID) sont impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. (Table adaptée de Lee and Chowdhury, 2011)

II.5.1 La déphosphorylation de γ -H2AX

La perte de γ -H2AX aux sites des DSBs est corrélée avec la réparation complète de l'ADN (Bouquet et al., 2006). Cependant, cette corrélation n'est vraie que pour de faibles niveaux de dommages à l'ADN, en dessous de 150 DSBs par génome (Bouquet et al., 2006 ; Banath et al., 2004). Quand pouvons-nous dire qu'une DSB est complètement réparée ? Des études suggèrent que la réparation des DSBs a lieu lorsque les deux brins de l'ADN se rejoignent alors que d'autres proposent que la réparation de la DSB a vraiment lieu une fois que la chromatine retourne à son état de compaction original (Kinner et al., 2008 ; Liu et al., 2008). Des études sur le mécanisme de retrait de γ -H2AX ont suggéré deux mécanismes non exclusifs : la déphosphorylation de γ -H2AX ou le retrait de γ -H2AX de la chromatine. Le premier mécanisme implique la déphosphorylation de γ -H2AX par des phosphatases, principalement par les phosphatases PP2A et PP4 (Chowdhury et al., 2005 ; Keogh et al., 2006 ; Chowdhury et al., 2008 ; Nakada et al., 2008). Le deuxième mécanisme du retrait de γ -H2AX se fait via la redistribution de la chromatine, via l'échange d'histones, remplaçant γ -H2AX par H2AZ pendant le remodelage de la chromatine via des histones acétyltransférases (Altaf et al., 2009 ; Kusch et al., 2004). Je vais m'intéresser à la déphosphorylation de γ -H2AX par les phosphatases.

Plusieurs phosphatases (PP2A, PP4, PP1, PP6 et Wip1) participent directement ou indirectement à la déphosphorylation de γ -H2AX (Freeman and Monteiro, 2010). La phosphatase PP1 a été décrite pour déphosphoryler γ -H2AX dans des nucléosomes *in vitro* (Canguilhem et al., 2005 ; Nazarov et al., 2003). Des cellules déplétées en PP4C (sous-unité catalytique de PP4) présentent des taux de γ -H2AX élevés même en absence de dommages à l'ADN (Chowdhury et al., 2008), ont un retard d'entrée en mitose, mais n'ont pas de défauts dans l'initiation du checkpoint G2/M (Nakada et al., 2008). Aussi, PP4C semble plutôt déphosphoryler γ -H2AX associé à la chromatine plutôt que dans le nucléoplasme (Nakada et al., 2008). La déplétion de la phosphatase PP6 par siRNA avant un traitement par des radiations ionisantes entraîne une persistance des foyers γ -H2AX et des foyers 53BP1, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes

(Douglas et al., 2010). La phosphatase Wip1 co-localise avec les foyers γ -H2AX après traitement par des radiations ionisantes (Macurek et al., 2010). Le tissu de rate de souris Wip1^{-/-} présente un taux basal de γ -H2AX plus élevé que celui des souris Wip1^{+/+} en absence de dommages à l'ADN (Moon et al., 2010). Aussi, la déplétion de Wip1 favorise la réparation des cassures étant donné que Wip1 inhibe les voies de réparation des DSBs, que sont la recombinaison homologue et le NHEJ (cf § II.6.1 : La réparation des cassures double brin) (Moon et al., 2010).

Bien que la contribution de chaque phosphatase reste à éclaircir, la phosphatase PP2A (cf § II.5.1.1 : La phosphatase PP2A) semble être la principale phosphatase pour γ -H2AX en réponse à la camptothécine (CPT), un inhibiteur de la topoisomérase I (cf chapitre III : les inhibiteurs de la topoisomérase I) (Chowdhury et al., 2005). L'inhibition pharmacologique de PP2A (acide okadaïque, fostriécine) ou le knockdown par siRNA augmentent le nombre de cellules présentant des foyers γ -H2AX, l'intensité des foyers et la durée de persistance des foyers après traitement par la CPT (Chowdhury et al., 2005). En effet, PP2A co-localise et se lie à γ -H2AX après traitement par la CPT.

Les revues de Freeman and Monteiro, 2010 et Lee and Chowdhury, 2011 décrivent la déphosphorylation des autres protéines de réponse aux dommages à l'ADN par PP2A comme entre autres ATM, DNA-PK et Chk2.

Table 5 : Les régulateurs positifs et négatifs des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.

Protein	Phospho site	Sequence	Positive regulators					Negative regulators					Binding partner	
			ATM	ATR	DNA-PK	CHK2	CHK1	PP5	PP1	PP2A	Wip1	PP4		PP6
ATM	S1981	EEG <u>S</u> QSTT												
NBS1	S343	PSL <u>S</u> QGVS												
RPA	T21	GGY <u>I</u> QSPG												
	S33	PAP <u>S</u> QAEK												
CHK2	T68	TVS <u>I</u> QELY												CHK2 FHA
	T383	LMR <u>I</u> LCGT												
	T387	LCG <u>I</u> PTYL												
CHK1	S317	YSS <u>S</u> QPEP												
	S345	ISF <u>S</u> QPTC												
H2AX	S139	TQA <u>S</u> QEY												MDC1 BRCT
BRCA1	S988	PIK <u>S</u> FVKT												
	S1387	GLS <u>S</u> QSDI												
	S1423	QHGS <u>S</u> QPSN												
	S1457	VLTS <u>S</u> QKSS												
	S1524	NYP <u>S</u> QEEL												
Claspin	T916	DLCTGKFT												
CDC25A	S76	RMGS <u>S</u> SEST												
	S123	RSH <u>S</u> DSLSD												
	S178	RQNS <u>S</u> APA												
	S278	PER <u>S</u> QEEES												
	S292	RRKS <u>S</u> MSGAS												
CDC25B	S309	RSP <u>S</u> MPCS												14-3-3
CDC25C	S216	RSP <u>S</u> MPEN												14-3-3
P53	S15	PPL <u>S</u> QETF												
	S20	ETF <u>S</u> DLQK												
	S37	PLP <u>S</u> QAMD												
E2F	S31	LDSS <u>S</u> QIVI												
	S364	RMGS <u>S</u> LRAP												
MDM2	S395	EDY <u>S</u> QST												
	S407	IYSS <u>S</u> QEDV												
MDMX	S342	HSL <u>S</u> TSDI												14-3-3
	S367	RTIS <u>S</u> APVV												14-3-3
	S403	SSES <u>S</u> QETI												

Les régulateurs ciblent les sites de phosphorylation en les phosphorylant (kinases) ou en les déphosphorylant (phosphatases). Les boîtes vertes et rouges indiquent que l'action du régulateur est respectivement positive (activation) ou négative (désactivation ou inhibition de l'activité) (D'après Freeman and Monteiro, 2010).

II.5.1.1 La phosphatase PP2A

II.5.1.1.1 Structure et fonctions de PP2A

La famille des sérine/thréonine phosphatases PP2A (protein phosphatase 2A) regroupe plusieurs holoenzymes (**figure 14**) impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont la régulation de la transcription, la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, l'apoptose, la traduction, la réplication de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, des voies de transduction des signaux, la protection contre le développement tumoral (Janssens and Goris, 2001 ; Janssens et al., 2005 ; Janssens et al., 2008). En fonction du type cellulaire, les holoenzymes PP2A sont responsables de la déphosphorylation de 30 à 50% des sérine/thréonine totaux de la cellule, soulignant l'importance de cette enzyme. Ces holoenzymes contiennent un noyau dimérique appelé «core», formé d'une sous-unité catalytique (C) et d'une sous-unité structurale (A), auquel peut être associé une sous-unité (B) variable.

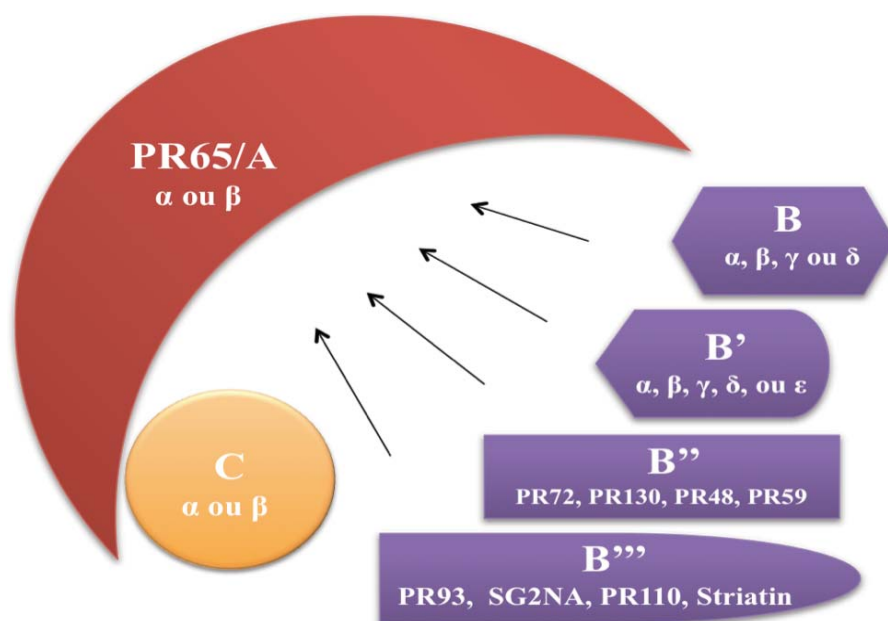


Figure 14 : La famille des sérine/thréonine phosphatases PP2A.

PP2A est un complexe hétérotrimérique composé de la sous-unité structurale PR65/A α ou β (en rouge), de la sous-unité catalytique C α ou β (en orange) et une des sous-unités régulatrice B (B (α , β , γ ou δ), B' (α , β , δ ou ϵ), B'' (PR72, PR130, PR48, PR59), B''' (PR93, SG2NA, PR110, Striatin)). Les sous-unités B régulent l'activité et la localisation des complexes PP2A (Adapté de Westermarck and Hahn, 2008).

La combinaison du core AC avec les différentes sous-unités de type B engendre un répertoire de nombreux holoenzymes qui est déterminant pour la spécificité et pour la régulation de l'activité de PP2A (Janssens et al., 2005). Outre les sous-unités variables de type B, un nombre croissant de protéines cellulaires peut interagir avec une ou plusieurs sous-unités de PP2A pour s'associer à un holoenzyme spécifique. Plus de cinquante partenaires cellulaires ont ainsi été identifiés comme formant des complexes stables avec PP2A, tels que des protéines kinases, des protéines du cytosquelette, des récepteurs et des facteurs de transcription, afin de contrôler les principales voies de signalisation intracellulaire (Hox, Wnt, Ras, etc) (Eichhorn et al., 2009).

La sous-unité catalytique (PP2AC)

La sous-unité catalytique cible des groupements phosphate sur des résidus sérine ou thréonine et même sous certaines conditions sur des résidus tyrosine (Fellner et al., 2003). L'activité catalytique de PP2A est codée par deux gènes distincts exprimés de manière ubiquitaire, les gènes des sous-unités C α et C β (Stone et al., 1987). Dûe à la présence d'un faible promoteur, la sous-unité C β est exprimée dix fois moins que la sous-unité C α (Khew-Goodall and Hemmings, 1988). Les deux sous-unités ont une masse moléculaire de 35 kDa et partagent 97% d'identité de séquence. L'expression de PP2AC est finement régulée dans la cellule à des niveaux traductionnels et post-traductionnels (Baharians and Schonthal, 1998). La perte de la sous-unité C α chez la levure et chez la souris est létale, soulignant l'importance de cette phosphatase dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Gotz et al., 1998).

La sous-unité structurale (PR65)

La sous-unité catalytique de PP2A (PP2AC) interagit avec la protéine échaffaudrice PR65 via des répétitions HEAT (Huntington/elongation/A-subunit/TOR) en C-terminal (Groves et al, 1999). Deux gènes alternatifs, PR65 α et PR65 β , codent les deux isoformes α et β de la protéine PR65 (Hemmings et al., 1990). La plupart des holoenzymes PP2A contiennent l'isoforme PR65 α , alors qu'une petite fraction (10%) contient l'isoforme PR65 β . Bien que les deux isoformes présentent 87% d'identité de séquence, PR65 β a des propriétés biochimiques uniques et ne peut pas être substitué à la perte de PR65 α chez la souris (Bosch et al., 1995). Ces deux transcrits alternatifs diffèrent

dans leur capacité à interagir avec les différentes sous-unités B régulatrices (Zhou et al., 2003).

Les sous-unités régulatrices B

15 gènes ont été identifiés dans le génome humain codant pour au moins 26 différents transcrits alternatifs des sous-unités B de l'holoenzyme PP2A. Ces sous-unités B médient la spécificité de substrat de l'holoenzyme PP2A (Janssens and Goris, 2001). Alors que PR65 α peut interagir avec toutes les sous-unités B régulatrices, PR65 β est incapable d'interagir avec les sous-unités B de la famille PR55 et montre une préférence pour la liaison avec PR72 (Zhou et al., 2003). Les sous-unités B ont été subdivisées en 5 familles distinctes, et ont en commun quelques acides aminés conservés qui leur permettent d'interagir avec les domaines HEAT en N-terminal de la sous-unité structurale PR65 (Li and Virshup, 2002).

II.5.1.1.2 Régulation de PP2A par des modifications post-traductionnelles

La régulation de PP2A passe (1) par l'association des différentes sous-unités régulatrices B avec le core enzyme de PP2A, permettant de former des holoenzymes avec des propriétés catalytiques, des localisations subcellulaires et des substrats spécifiques ; mais aussi (2) par des modifications post-traductionnelles.

Le recrutement de la sous-unité B au « core » est finement régulé par la méthylation et la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de PP2AC. La méthylation en leucine 309 catalysée par la LCMT1 (S-adenosylmethionine-dependent leucine carboxyl methyltransferase 1) est requise pour la liaison des membres de la famille PR55B et non pour les autres sous-unités B (Longin et al., 2007). La méthylation en leucine 309 peut être reversée par la PME-1 (phosphatase méthylesterase 1) (Ogris et al., 1999). Quant à la phosphorylation, elle se produit soit en tyrosine 307 soit en thréonine 304 (Longin et al., 2007). La phosphorylation en tyrosine 307 empêche le recrutement des membres β de la famille PR55B et PR61 au core enzyme (Chen et al., 1992). Ce site de phosphorylation est régulé par l'oncogène c-SRC, ce qui peut suggérer que l'inhibition d'une ou plusieurs sous-unités pourrait être requise pour la transformation induite par c-SRC. La formation de l'holoenzyme trimérique et l'activation de la sous-unité PP2Ac sont

sous le contrôle de la PME-1 (phosphatase méthylesterase 1) et de la PTPA (peptidyl prolyl isomerase). La PTPA, qui se lie à la sous-unité structurale de PP2A, est un activateur essentiel et spécifique de la forme inactive de PP2A (Longin et al., 2004).

Les sous-unités B régulatrices sont sujettes à des phosphorylations, notamment celles de la famille B'. La phosphorylation de PR61δ pourrait réguler l'activité de PP2A *in vivo*, étant donné que la phosphorylation de PR61δ par PKA (Protein Kinase A) *in vitro* change la spécificité de substrat de l'enzyme, sans dissocier la sous-unité B' de PP2A (Usui et al., 1998).

II.5.1.1.3 Rôle de PP2A dans la transformation cellulaire

PP2A régule de nombreuses voies de signalisation comme Wnt, PI3K/Akt, et c-Myc, qui sont impliquées dans le processus de transformation tumorale (Eichhorn et al., 2009). Par exemple, l'activation de l'oncogène Akt est inhibée par PP2A. Akt est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation pro-tumorale (Manning and Cantley, 2007). De plus, de nombreuses études montrent que la kinase Akt est dérégulée dans les cancers humains (Carpten et al., 2007). L'activation d'Akt est finement régulée par phosphorylations en thréonine 308 ou sérine 473. Les holoenzymes PP2A contenant PR55α déphosphorylent directement Akt en thréonine 308, inhibant ainsi les voies de signalisation de pro-survie médiées par Akt (Kuo et al., 2008).

Des mutations génétiques des sous-unités de PP2A (Eichhorn et al., 2009), la dérégulation de la méthylation de la sous-unité PP2AC (Guenin et al., 2008) ou la surexpression d'inhibiteurs spécifiques (Junttila et al., 2007) aboutissent à l'inhibition de PP2A. Divers travaux ont permis l'identification de plusieurs protéines oncogéniques comme le facteur CIP2A (cancerous inhibitor of PP2A), un inhibiteur spécifique de PP2A qui est surexprimé dans divers types de cancers humains et qui, en inhibant PP2A, empêche la déphosphorylation de c-Myc et prévient ainsi sa dégradation (Junttila et al., 2007 ; Come et al., 2009).

De façon remarquable, de nombreuses protéines virales peuvent s'associer aux protéines PP2A et former des complexes fonctionnels capables de détourner la signalisation cellulaire. Par exemple, les virus transformants à ADN de la famille des *papovae* codent pour des protéines comme la protéine transformante moyen T du virus polyome et les antigènes petit t des virus polyome ou SV40. Ces protéines virales sont

capables de se substituer à certaines sous-unités régulatrices de type B de PP2A pour interagir directement avec le core AC afin de réguler la réplication virale et la transformation cellulaire (Benjamin, 2001).

II.6 La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

II.6.1 La réparation des cassures double-brin

Deux principaux mécanismes sont décrits pour réparer les DSBs : la recombinaison homologue (RH) et la ligature d'extrémités non homologues canonique (C-NHEJ : canonical non-homologous end joining) (**figure 15**). La recombinaison homologue est considérée comme un mécanisme fidèle de réparation car le brin lésé recopie une séquence homologue. Quant à la ligature d'extrémités non homologues (C-NHEJ), elle répare la cassure sans nécessiter d'homologie de séquence (Rass et al., 2012).

II.6.1.1 La réparation des cassures double-brin par jonction des extrémités non-homologues canonique (C-NHEJ)

Le mécanisme majoritaire de réparation des DSBs est le NHEJ canonique (C-NHEJ) (**figure 15B**). Il relie directement les extrémités clivées sans utiliser une séquence homologue comme modèle pour reconstituer le brin d'ADN. Il peut donc se produire pendant toutes les phases du cycle cellulaire. Lors de ce processus, la DSB est reconnue par l'hétérodimère Ku70/Ku80, qui recrute par la suite DNA-PKcs (Ciccio and Elledge, 2010). Si nécessaire, les extrémités de l'ADN peuvent être prises en charge par des nucléases (comme Artemis) ou des ADN polymérases (telles que Polμ ou Polλ) pour créer des extrémités compatibles (Lieber and Wilson, 2010). Enfin, le complexe de ligation, composé de l'ADN ligase IV et ses cofacteurs XRCC4 et XLF/Cernunnos permettent la ligation des extrémités (Buck et al., 2006).

II.6.1.2 La réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH)

Le deuxième grand mécanisme de réparation des DSBs est la recombinaison homologue (**figure 15A**), qui utilise la séquence homologue présente sur la chromatide soeur pour réparer fidèlement le dommage. Ce mécanisme se produit donc

majoritairement lors des phases S/G2 du cycle cellulaire. Le processus de réparation par RH commence par la résection des extrémités de l'ADN par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (Heyer et al., 2010 ; Stracker and Petrini, 2011), la protéine CtIP (CtBP-interacting protein) (Limbo et al., 2007 ; Sartori et al., 2007) et d'autres exonucléases, générant ainsi de l'ADN simple brin en 3' (Wyman and Kanaar, 2006). L'ADN simple brin est ensuite couvert de protéines RPA (Replication protein A) qui enlève les structures secondaires (Sugiyama et al., 1997). Par la suite, BRCA2 permet le remplacement de RPA par Rad51 pour former un filament nucléoprotéique qui cherche la séquence homologue sur la chromatide soeur. Après l'invasion du brin, catalysée notamment par Rad51, l'élongation de l'ADN se réalise en utilisant la séquence intacte comme modèle. Après restauration de la séquence manquante, la deuxième extrémité de l'ADN clivée est capturée et les jonctions sont résolues (Pardo et al., 2009). Cette étape de résolution peut être accomplie par la formation de deux jonctions Holiday, qui sont par la suite résolues pour donner des produits cross-over ou pas (modèle de la double jonction Holiday). Un modèle alternatif de la RH, le SDSA (synthesis-dependent strand annealing), n'implique pas de jonctions Holiday et donne seulement des produits non cross-over (Maher et al., 2011).

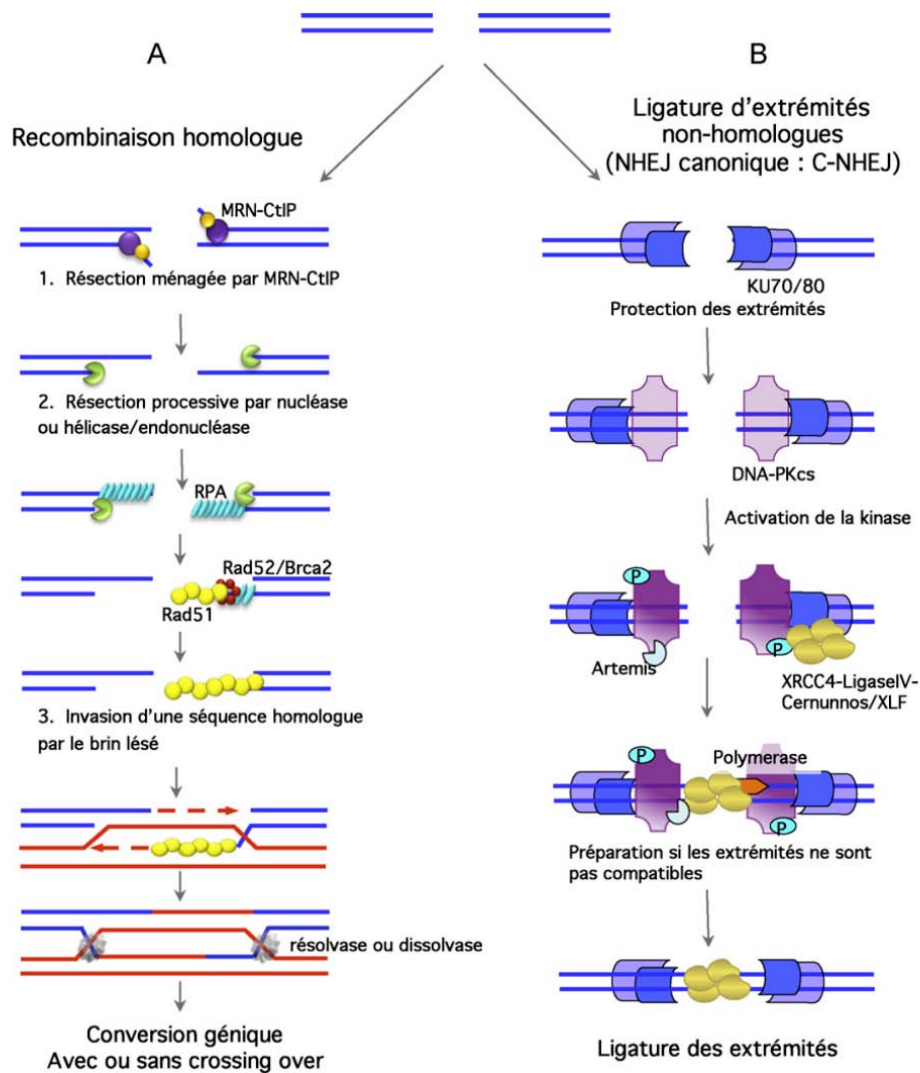


Figure 15 : Réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH) et ligature d'extrémités non-homologues (NHEJ).

A- La recombinaison homologue utilise une séquence homologue intacte pour réparer la cassure double-brin et est initiée par une résection d'ADN simple-brin. Le modèle propose que le complexe MRN, en association avec CtIP, initie la résection (étape 1), ce qui permet le recrutement d'autres nucléases (comme Exo1), responsables de la formation d'extrémités sortantes simple-brin (étape 2). Ces régions simple-brin sont couvertes par la protéine RPA. BRCA2 déplace RPA et charge la protéine Rad51. L'invasion du brin lésé de la séquence homologue est médiée par le filament d'ADN simple-brin couvert de Rad51 (étape 3). Selon le sens de résolution des intermédiaires par les résolvas, la conversion génique est associée ou non à un crossing-over.

B- La ligature d'extrémité non-homologue (NHEJ) ne nécessite pas d'homologie de séquence. Les extrémités d'ADN sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la sous-unité catalytique DNA-PKcs. L'activation de celle-ci permet le recrutement du complexe XRCC4/ADN ligase IV aidé par Cernunnos/XL-F. Une préparation des extrémités par la protéine Artémis et l'intervention de polymérases peuvent être nécessaires avant l'étape de ligature (D'après Rass et al., 2012).

II.6.2 Exemples d'outils pour étudier la réparation des cassures double-brin

La **figure 16** présente des exemples de systèmes rapporteurs de la RH et du NHEJ. Ces constructions sont généralement intégrées dans le génome. Le principe général de ses essais est la restauration de l'expression d'un marqueur, accompagné dans certain cas de l'inactivation d'un autre gène. Mao *et al* interrompent le gène GFP avec un intron contenant un exon adénoviral (AD) flanqué par deux sites d'enzymes I-SceI. La réparation des cassures double-brin induites par les deux enzymes entraîne la perte de l'exon intervenant et l'expression d'une GFP fonctionnelle (Mao et al., 2008). Guirouilh-Barbat *et al* ont développé un essai similaire avec des sites I-SceI compatibles ou pas compatibles, mais ils utilisent des antigènes de surface (Guirouilh-Barbat et al., 2004). Un essai similaire a été développé avec la GFP entre deux sites I-SceI et une RFP (Red Fluorescent Protein) en aval, ce qui résulte en une perte de la GFP et l'expression d'une RFP après réparation des DSBs induites par les enzymes I-SceI (Coleman and Greenberg, 2011).

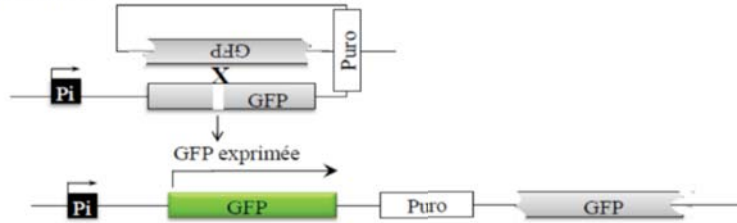
Le test le plus utilisé pour mesurer la recombinaison homologue est le test DR-GFP développé par Pierce et Jasin (Pierce et al., 1999). Le rapporteur contient deux séquences GFP séparées par un marqueur de sélection. La séquence GFP en 5' est inactivée par un site I-SceI et des codons STOP internes, empêchant l'expression de la GFP. La GFP tronquée en 3' sert de modèle pour la réparation après l'induction d'une DSB par I-SceI. La réparation de la cassure par conversion génique en utilisant la séquence GFP en aval entraîne la restauration du gène GFP et le pourcentage de cellules exprimant la GFP peut être déterminé par analyse au FACS.

1- Système rapporteur de la Recombinaison Homologue (RH)

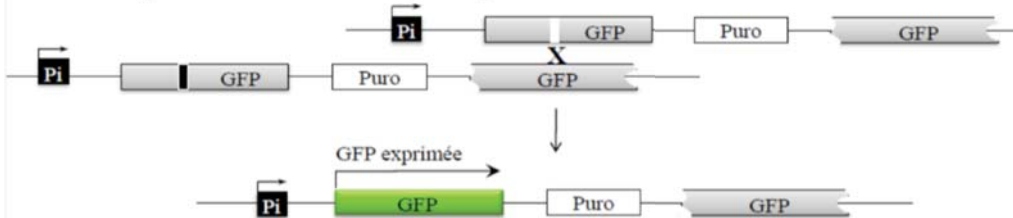
A : substrat du RH



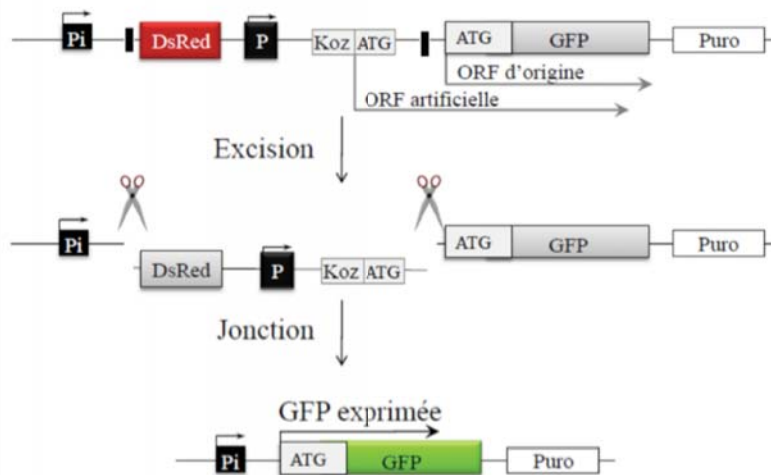
B : RH intra-chromatide



C : échange de chromatides soeurs inégal



2- Système rapporteur de la ligation d'extrémités non homologues (NHEJ)



Pi promoteur inductible (Tet)
I site de clivage I-SceI
Koz séquence Kozak

Figure 16 : Les systèmes rapporteurs du RH et du NHEJ.

1-Substrat du RH. Deux cassettes inactives codant pour la GFP sont placées en tandem sous le contrôle d'un promoteur inductible. La cassette en 5' est inactive par l'insertion d'un site de clivage I-SceI ; la cassette en 3' est inactive par la délétion de séquences en 5' et 3'. La recombinaison entre ces deux cassettes (conversion génique) restaure une séquence fonctionnelle codant pour la GFP, soit par recombinaison homologue intra-chromatide (B) ou par échange de chromatides sœurs (C) le pourcentage de cellules exprimant la GFP peut être déterminé par fluorescence (FACS, microscopie).

2-Substrat du NHEJ. Le gène GFP n'est pas exprimé car il est sous le contrôle d'un codon d'initiation en dehors du cadre de lecture (ATG artificiel) ; l'ATG artificiel est favorisé par la présence d'une séquence consensus Kozak. Un deuxième rapporteur (dsRed) est sous le contrôle d'un promoteur inductible. Le clivage et l'excision du fragment DsRed/KozATG met la séquence GFP sous son codon naturel ATG et permet ainsi son expression. Les événements de ligation sont analysés par détection de fluorescence (analyse FACS ou microscopie).

Chapitre III : Les inhibiteurs de la topoisomérase I

III.1 Les ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires qui régulent la topologie de la double hélice d'ADN, en assurant la suppression des surenroulements (positifs ou négatifs) de l'ADN associés aux processus cellulaires de réplication et de transcription (Forterre et al., 2007). Elles ont la capacité à introduire des coupures transitoires de l'ADN simple ou double-brin. Les cellules somatiques humaines expriment six gènes d'ADN topoisomérases (Pommier et al., 2010) : quatre topoisomérases de type I et deux topoisomérases de type II (Top2 α et Top2 β) (**figure 17**). Les cellules germinales expriment en plus Spo11, une topoisomérases de type II (Bergerat et al., 1997). Pour exécuter leur fonction catalytique, les topoisomérases de type I clivent un brin de l'ADN à la fois et les topoisomérases de type II clivent les deux brins de l'ADN. Les quatre topoisomérases de type I sont : la topoisomérase I nucléaire (Top1), la topoisomérase I mitochondriale (Top1mt) et les topoisomérases 3 α et β (Top3 α et Top3 β). Les topoisomérases de type I ont été subdivisées en deux groupes, type IA et type IB, sur la base du côté de la cassure de l'ADN sur lequel elles se lient de façon covalente et forme le complexe de clivage. Les enzymes Top3 appartiennent au groupe type IA et se lient à l'extrémité 5' du brin coupé, comme les topoisomérases de type II. La Top1 et la Top1mt appartiennent au groupe type IB et se lient à l'extrémité 3' du brin coupé (Pommier et al., 2010) (**figure 18**).

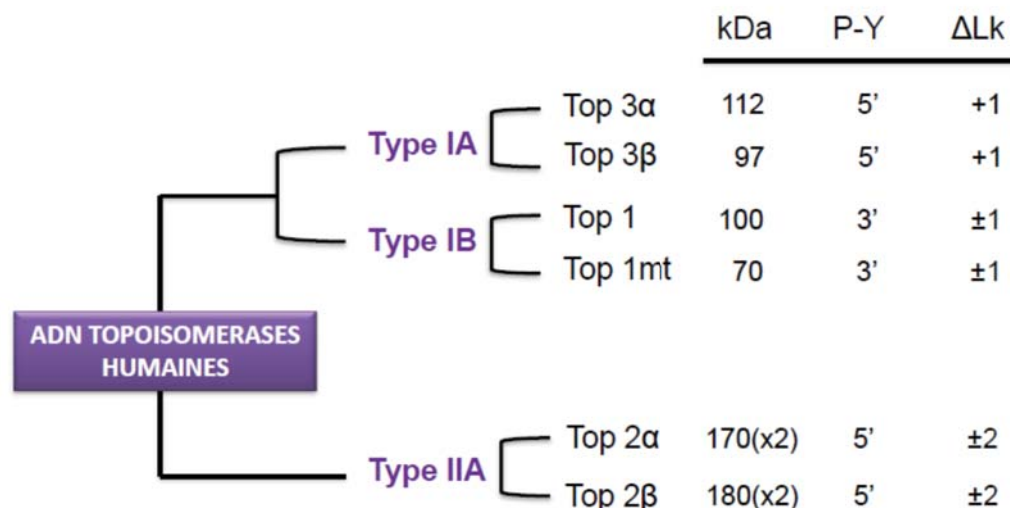


Figure 17 : Classification des ADN topoisomérases humaines.

Les cellules somatiques humaines expriment six gènes d'ADN topoisomérases : quatre topoisomérases de type I et deux topoisomérases de type II. kDa : masses moléculaires calculées. (x2) : dimère. Les ADN topoisomérases de type IB sont les seules enzymes qui forment des complexes de clivage avec des intermédiaires phosphotyrosyl en 3' (3'-P-Y). ΔLk : nombre de liaison produit par chaque cycle catalytique. Les enzymes de type I clivent en une étape et les enzymes de type II clivent en deux étapes. Les enzymes de type IA sont les seules à relaxer seulement les superenroulements négatifs et non les superenroulements positifs (ΔLk = +1).

(Adapté de Pommier et al., 2010)

Parmi les topoisomérases, la Top1 et les Top2α et β ont soulevé un intérêt particulier en raison du fait qu'elles sont la cible d'agents anticancéreux. Les camptothécines sont des inhibiteurs de Top1 extrêmement sélectifs (Pommier et al., 2006 ; Pommier, 2009) (cf § III.3.1 : Stabilisation des complexes Top1-ADN par les inhibiteurs de topoisomérase I) et parmi les inhibiteurs de Top2, les plus spécifiques sont l'étoposide et le téniposide (Nitiss, 2009b).

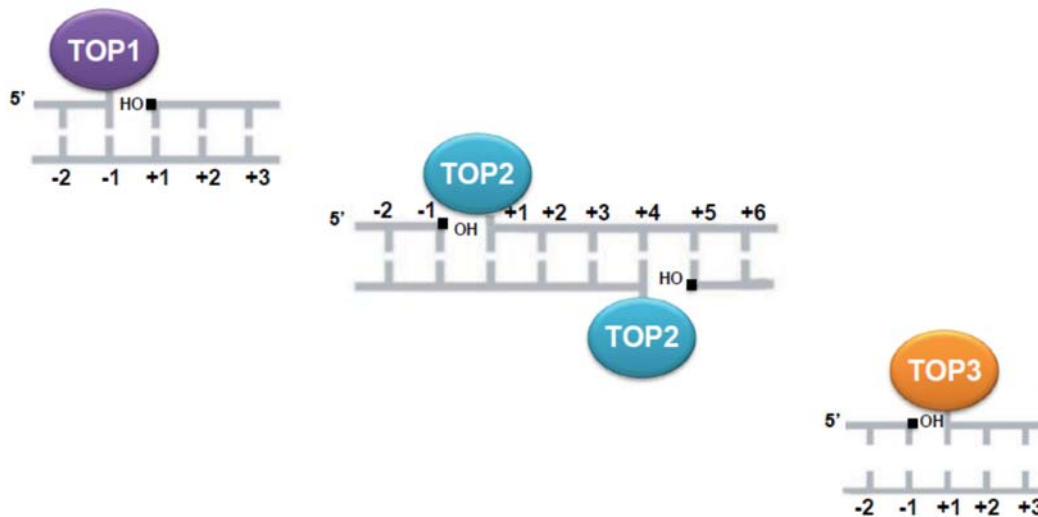


Figure 18 : Schémas des complexes de clivage des topoisomérases humaines.

Les ADN topoisomérases 1 (TOP1) se lient à l'ADN double brin et forment des complexes covalents en 3' des cassures. Les ADN topoisomérases 2 (TOP2) et 3 (TOP3) forment des complexes covalents en 5' des cassures.

(D'après Pommier et al., 2010)

III.2 Fonctions biologiques de la topoisomérase I

III.2.1 Relaxation de l'ADN

La fonction principale de la Top1 est de relaxer l'ADN qui est compacté dans les régions en cours de transcription et de réplication (Champoux, 2001 ; Wang, 2002). Des super-enroulements positifs et négatifs de l'ADN sont produits respectivement devant et derrière les complexes transcriptionnels en cours de progression (Liu and Wang, 1987). La Top1 peut éliminer les super-enroulements négatifs et positifs de l'ADN (Champoux, 2001 ; Wang, 2002) et peut ainsi relaxer l'ADN des deux côtés des complexes transcriptionnels. Toutefois, la Top1 semble plus efficace pour éliminer les super-enroulements positifs de l'ADN et tend à former davantage de complexes de clivage sur l'ADN super-enroulée positivement versus négativement (McClendon and Osheroff, 2006).

Le cycle catalytique de la Top1 se décompose en quatre étapes (Pommier et al, 1998) (**figure 19**) :

- 1- liaison de la Top1 à l'ADN
- 2- clivage d'un brin d'ADN
- 3- relaxation de l'ADN
- 4- religation et libération de la Top1

La première étape consiste en une liaison non covalente de la Top1 à l'ADN au niveau de sites privilégiés dont la nature semble être plutôt déterminée par le degré de surenroulement et de courbure de l'ADN que par la spécificité de séquence, même si une préférence existe pour les motifs 5'-(A/T) (G/C) (A/T) T-3', où le dernier T indique le site de coupure (Krogh et al., 1991 ; Jaxel et al., 1991). La deuxième étape est la coupure d'un brin de la double hélice par la Top1 par réaction de trans-estérification qui aboutit à la formation d'un lien covalent tyrosyl-phosphodiester entre la tyrosine catalytique (Tyr 723) et l'extrémité 3' du brin coupé (Champoux, 1981). Cette étape ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP et aboutit à la formation d'un complexe covalent ADN-Top1 transitoire appelé complexe de clivage (nommé Top1cc). Sa durée de vie dans les conditions physiologiques est extrêmement brève, mais suffisante pour permettre au brin coupé en aval du complexe d'effectuer une rotation autour du brin non coupé pour supprimer un super-tour d'ADN. Puis, le brin coupé est reliqué par réaction inverse de trans-estérification par attaque de la liaison 3'-tyrosyl phosphodiester par l'extrémité 5'-OH libre du brin coupé. La continuité du brin d'ADN est restaurée et la Top1 se détache de son substrat.

Une caractéristique unique des enzymes Top1 est leur mécanisme de relaxation de l'ADN par la « rotation contrôlée » (Stewart et al., 1998). En d'autres termes, les enzymes Top1 relaxent l'ADN en permettant à l'extrémité 5'OH de pivoter autour du brin intact, ce qui permet de supprimer un tour d'enroulement de l'ADN. Cette réaction ne requiert pas d'ATP ou d'ions divalents, ce qui est différent des enzymes Top2 qui requièrent l'hydrolyse de l'ATP ainsi que du Mg^{2+} (Nitiss, 2009a ; Deweese et al., 2008) et des enzymes Top3, qui requièrent du Mg^{2+} (mais non l'ATP) pour leur catalyse (Goulaouic et al., 1999).

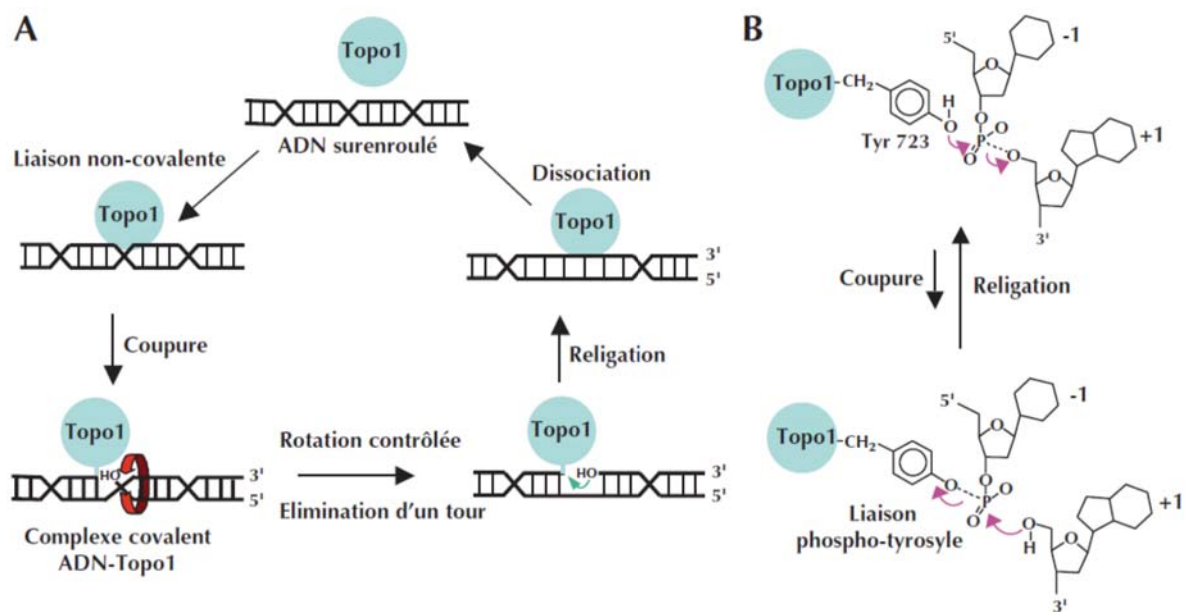


Figure 19 : Cycle catalytique de la topoisomérase I nucléaire humaine.

A- Le cycle catalytique de la Topo1 nucléaire humaine se décompose en quatre étapes. La première étape consiste en une liaison non covalente de la Topo1 à l'ADN. Puis, la coupure d'un brin de la double hélice par la Topo1 est réalisée par réaction de transestérification. Ensuite, le brin coupé est religué par réaction inverse de transestérification. La Topo1 est par la suite dissociée de l'ADN.

B- Equilibre de coupure/religation catalysé par la Topo1 humaine. La réaction de coupure est une réaction de trans-estérification résultant de l'attaque du groupement phénol de la tyrosine 723 sur le groupement phosphate de la liaison phosphodiester de l'ADN. La réaction inverse de religation résulte de l'attaque de la liaison phospho-tyrosyle par le groupement hydroxyle de l'extrémité 5' du brin coupé.

(D'après Pourquier and Lansiaux, 2011)

III.2.2 Fonctions indépendantes de l'activité de relaxation de l'ADN

En plus de son activité dans la relaxation de l'ADN, la Topo1 peut réguler d'autres fonctions indépendamment de son activité de clivage/religation de l'ADN.

III.2.2.1 Rôles de la Topoisomérase I dans la transcription

La Top1 semble jouer un rôle dans la régulation de la transcription. L'association de la Top1 avec les protéines du complexe de transcription permet d'activer l'initiation de la transcription en stimulant la formation du complexe TFIID-TFIIF (Shykind et al., 1997). L'activité de clivage de la Top1 n'est pas nécessaire pour observer cet effet puisqu'une Top1 catalytiquement inactive, pouvant se lier à l'ADN sans pouvoir le couper, est capable d'induire cette activation. Un système de double-hybride a permis l'identification de protéines nucléaires riches en séquences peptidiques arginine-sérine ou sérine-arginine appelées topors (topo-isomerase I-binding RS proteins) (Haluska et al., 1999). L'interaction des topors avec la partie N-terminale de la Top1 permettrait le recrutement de l'ARN polymérase II directement au niveau des sites de transcription. Une étude a également montré que la Top1 possédait une activité kinase spécifique pour des facteurs d'épissage (Rossi et al., 1996 ; Soret et al., 2003). La même étude montre que la phosphorylation de ces facteurs est réduite en présence d'inhibiteurs de Top1. Ces résultats suggèrent donc un rôle de la Top1 dans la maturation des ARN pré-messagers. Aussi, la Top1 permet, grâce à sa liaison avec le facteur d'épissage ASF/SF2, d'éviter d'une part les interférences entre les processus cellulaires de réplication et transcription, et d'autre part la formation de cassures de l'ADN liées à l'accumulation de structures hybrides ARN-ADN (R-loops) dans les régions transcrites, contribuant ainsi au maintien de la stabilité du génome (Tuduri et al., 2009).

III.2.2.2 Rôles de la topoisomérase I dans la signalisation des dommages à l'ADN

Deux hypothèses ont été proposées pour donner une signification biologique au fait que la Top1 puisse être sensible à une si grande variété de lésions de l'ADN et soit piégée quand ces lésions sont présentes à proximité d'un site de coupure de l'enzyme.

Une première hypothèse suggère un rôle de la Top1 dans la réparation de l'ADN. Sa séquestration constituerait un « étiquetage » de la lésion qui permettrait un recrutement des protéines de réparation, directement au niveau du site endommagé. L'association de la Top1 avec la protéine p53 piégée sur de l'ADN génomique de cellules soumises à un rayonnement ultraviolet est un argument en faveur de cette hypothèse (Mao et al., 2000).

P53 est un facteur de transcription dont l'expression est stimulée par les dommages de l'ADN et dont l'interaction avec la Top1 est connue pour stimuler l'activité catalytique de l'enzyme (Gobert et al., 1996). L'association Top1-p53 permettrait de recruter d'autres facteurs interagissant directement avec p53 tels que GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible gene) qui, en association avec la protéine PCNA (proliferation cell nuclear antigen), est connue pour stimuler la synthèse d'ADN associée au processus de réparation par excision nucléotidique (Smith et al., 1994). Ainsi, la Top1 aurait un rôle de protection des cellules vis-à-vis des dommages infligés à l'ADN génomique. D'autres résultats permettent d'envisager une seconde hypothèse selon laquelle la Top1 piégée sur de l'ADN endommagé serait au contraire un obstacle à la réparation des lésions et contribuerait à la mort cellulaire. Si la Top1 intervenait dans la réparation, des cellules exprimant fortement cette enzyme devraient être plus résistantes à des agents endommageant l'ADN. Or, des levures surexprimant la Top1 sont davantage sensibles aux agents alkylants, aux rayonnements ultraviolets et aux radiations ionisantes que les levures sauvages correspondantes (Nitiss et al., 2001). L'activité de la Top1 est bien responsable de ce phénomène puisque la surexpression d'une enzyme inactive ne confère pas d'hypersensibilité à ces agents. La séquestration de la Top1 servirait à déclencher ou à amplifier un programme de mort cellulaire en participant à la fragmentation de l'ADN, telle une endonucléase au cours du processus d'apoptose. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que la fragmentation de l'ADN de cellules leucémiques traitées par de la staurosporine, un inhibiteur de kinase qui n'est pas connu pour endommager l'ADN, s'accompagne aussi de la formation de Top1cc. L'apoptose induite par la staurosporine est moins importante dans des cellules leucémiques ne contenant pas de Top1 que dans les cellules témoins, et s'accompagne d'une moindre fragmentation de l'ADN génomique, suggérant bien une implication de la Top1 dans ce type de mort cellulaire (Pourquier et al., 2001).

III.3 Stabilisation des complexes Top1-ADN

L'activité de clivage/religation de la Top1 est remarquablement rapide (jusqu'à 6,000 cycles par minutes) et dans des conditions physiologiques, les complexes Top1-ADN sont presque indétectables car l'étape de religation de l'ADN est beaucoup plus rapide que l'étape de clivage de l'ADN (Pommier, 2013 ; Seol et al., 2012). Malgré cela, la Top1 peut être prise au piège sélectivement lorsque l'ADN est dans un état clivé. Les complexes Top1-ADN peuvent être stabilisés de manière extrêmement sélective par la camptothécine et ses dérivées appelés inhibiteurs (ou poisons) de Top1. Les complexes Top1-ADN sont également stabilisés par de nombreuses lésions de l'ADN et lors de l'apoptose.

III.3.1 Stabilisation des complexes Top1-ADN par les inhibiteurs de Top1

Les poisons de Top1 agissent une fois que l'enzyme a coupé l'ADN. Ils empêchent spécifiquement la religation de l'ADN, ce qui se traduit par une augmentation de la quantité de complexes ADN-Top1 (Top1cc) (Hsiang et al., 1985). Cette inhibition n'est qu'un ralentissement de la religation lié à la présence du poison au niveau du site actif de l'enzyme qui empêche le bon positionnement de l'extrémité 5'-OH libre pour que la réaction de transestérification inverse puisse s'opérer. On parle alors de stabilisation des Top1cc. Dans cette catégorie, figurent la camptothécine (CPT) et ses nombreux dérivés, les indolocarbazoles et les indénoisoquinolines (**figure 21**).

La camptothécine (CPT) est un alcaloïde isolée pour la première fois de l'écorce d'un arbre originaire de chine, *Camptotheca accuminata* (Wall and Wani, 1995). La CPT stabilise transitoirement les Top1cc et prévient la religation des Top1cc (Hsiang et al., 1985) (**Figure 20**). Plusieurs observations démontrent la sélectivité de la CPT envers la Top1 : (1) seulement l'isomère naturel de la CPT est actif contre la Top1 (Hsiang et al., 1989b ; Jaxel et al., 1989) ; (2) des levures délétées pour le gène *TOP1* sont résistantes à la CPT (Eng et al., 1988) ; (3) des cellules résistantes à la CPT portent des mutations précises au niveau du gène *TOP1* (Pommier et al., 1999), et (4) les plantes qui produisent la CPT portent une mutation de la Top1 (N722S) (Sirikantaramas et al., 2008) qui rend l'enzyme

immune à la CPT (Fujimori et al., 1995). Trois dérivés solubles de la CPT sont utilisés en clinique : le topotecan, l'irinotecan (dans le monde entier), et le belotecan (Corée du sud) (**Fig 21A**). Le topotecan (TPT, Hycamtin®) est utilisé dans le traitement des cancers ovariens et des cancers pulmonaires à petites cellules. L'irinotecan (CPT-11, Campto®) est utilisé pour les cancers colorectaux. C'est une prodrogue qui doit être hydrolysée en SN-38, mille fois plus actif (Rivory et al., 1996) ; cette activation est principalement réalisée dans le foie grâce à l'action de carboxylestérases. Le belotécan présente des résultats cliniques intéressants dans le traitement du cancer de l'ovaire. Les CPTs sont actuellement les seuls inhibiteurs de Top1 cliniquement approuvés. Cependant, les CPTs ont plusieurs limitations. (1) Elles sont chimiquement instables et sont rapidement inactivées en carboxylate dans le sang. (2) Les Top1cc réversent dans les minutes après retrait du médicament, ce qui nécessite de longues perfusions. (3) Les cellules surexprimant les transporteurs ABCG2 et ABCB1 sont résistantes à la CPT. (4) Les effets secondaires sont potentiellement sévères (diarrhée et neutropénie).

La CPT est une molécule pentacyclique (A-E) avec un carbone asymétrique en position 20 dont la configuration est cruciale pour l'activité de la molécule, seule la forme 20S étant active. A pH physiologique, il existe un équilibre entre la forme lactone (cycle E fermé) insoluble dans l'eau et la forme carboxylate (cycle E ouvert) plus soluble mais inactive, d'où l'inactivation des CPTs (**figure 21A**). Les dérivés (gimatécan, belotécan, lurtotécan, et exatécan) ont été développés afin d'améliorer la solubilité et la tolérance en clinique et permettre une administration par voie orale. Cependant, ils conservent l'instabilité chimique des camptothécines. Deux approches ont été entreprises pour pallier à cette instabilité des camptothécines médiée par l'ouverture du cycle E. L'addition d'un groupe méthylène au niveau du cycle E, comme pour les homocamptothécines (**figure 21B**), limite l'ouverture du cycle E (Lavergne et al., 1998) mais deviennent irréversiblement convertis en carboxylate inactif (Urasaki et al., 2000). La deuxième approche a consisté à convertir le cycle E en un cycle à cinq membres. Ces dérivés α -céto (Hauteffaye et al., 2003) illustrés par le dérivé S39625 (**figure 21B**) (Takagi et al., 2007) sont des composés synthétiques très puissants contre la Top1 et les cellules cancéreuses.

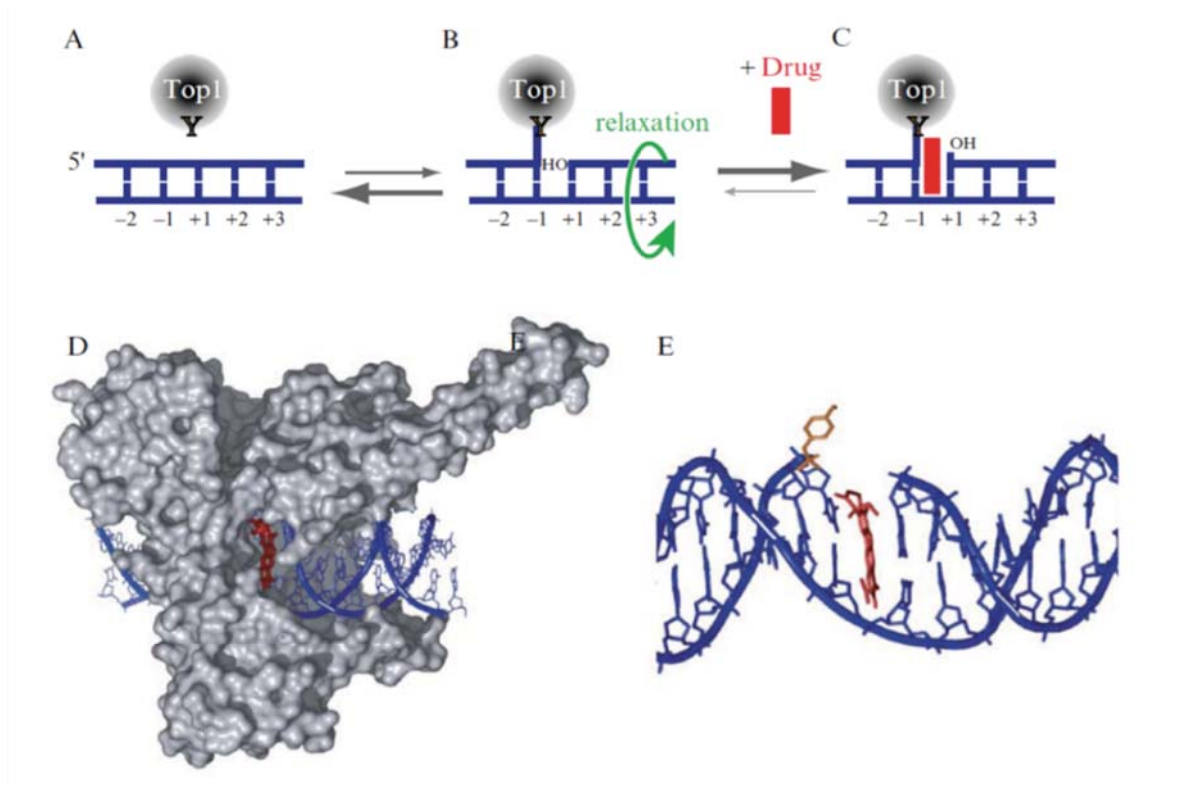


Figure 20 : La stabilisation des complexes de clivage Top1-ADN par les inhibiteurs camptothécines et non-camptothécines.

A- Dans les conditions physiologiques, Top1 s'associe avec la chromatine de façon non-covalente. **B-** Une petite fraction de la Top1 forme des complexes de clivage qui relaxent l'ADN superenroulé par rotation contrôlée du brin clivé autour du brin intact (flèche verte). **C-** Des médicaments anti-cancéreux piègent réversiblement les complexes de clivage Top1-ADN, en inhibant l'étape de religation. **D-** Structure cristalline de la camptothécine liée au complexe de clivage Top1-ADN. Top1 (gris), camptothécine (rouge), ADN (bleu) **E** Même structure que dans le panel D sans la Top1, mais avec la tyrosine catalytique (en orange). La camptothécine (en rouge) est intercalée entre les paires de base de part et d'autre du site de clivage de la Top1.

(D'après Pommier, 2006)

Le premier inhibiteur Top1 non-camptothécine (**Figure 21C**) atteignant les études cliniques a été l'édotecarin. Cependant, comme les autres indolocarbazoles, il affecte d'autres cibles cellulaires en plus de la Top1, comme l'ADN. Deux familles d'inhibiteurs Top1 non-camptothécines sont en développement clinique : les indénoisoquinolines et les dibenzonaphthyridinones (**Figure 21C**) (Pommier and Cushman, 2009).

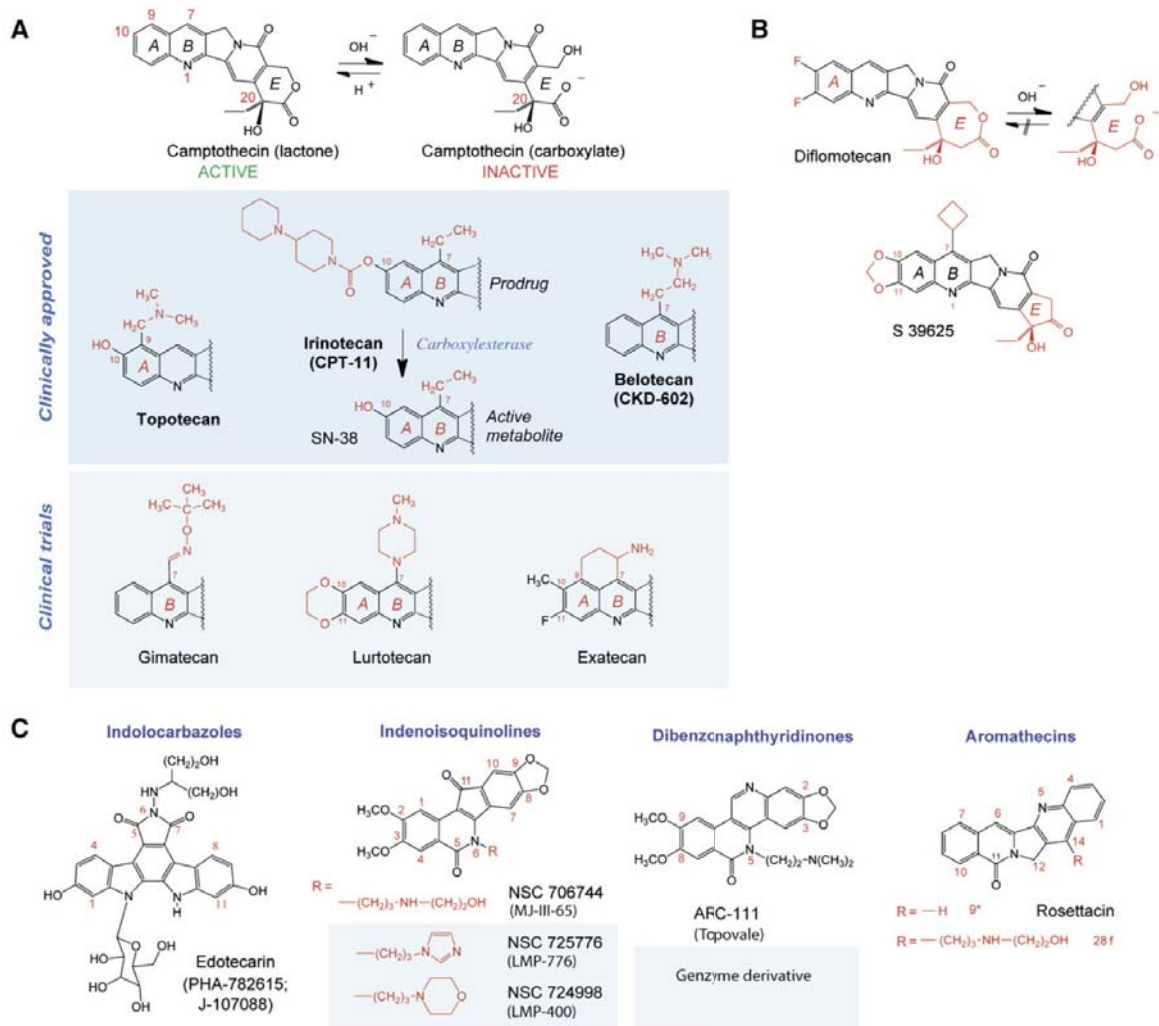


Figure 21 : Les inhibiteurs de Top1.

A- La camptothécine et ses dérivés utilisés en clinique. Présentation du cycle α -hydroxylactone E réversible de la camptothécine. Le topotecan et l'irinotecan sont les dérivés de la camptothécine approuvés par la FDA « Food and Drug Administration ». L'irinotecan est une pro-drogue ; son métabolite actif est le SN-38. Le belotecan est approuvé en Corée du Sud.

B- Les dérivés synthétiques de la camptothécine modifiés au niveau du cycle E. Alors que le diflomotecan (un homocamptothécine) peut toujours être converti irréversiblement en carboxylate, le dérivé α -kéto S39625 est chimiquement stable et reste un puissant inhibiteur de Top1. **C-** Les non-camptothécines. Les indenoisoquinolines et un dibenzonaphthyridinone sont en étude clinique.

(D'après Pommier et al., 2010)

Les inhibiteurs catalytiques interfèrent avec l'enzyme libre ou avec l'ADN et l'empêchent d'interagir avec son substrat. Ils peuvent aussi inhiber la réaction de coupure de l'ADN. L'utilisation de ce type d'inhibiteur empêche la formation de cassures simple-brin de l'ADN nécessaire à la relaxation de l'ADN. Ces inhibiteurs agissent à des concentrations souvent élevées ($> 1\mu\text{M}$) et ont d'autres cibles que la Top1 (Bailly, 2000). Ils ne sont pas développés en clinique actuellement.

III.3.2 Stabilisation des complexes Top1-ADN par les modifications de l'ADN

De par l'abondance de la Top1 dans le génome (Baranello et al., 2010), la Top1 rencontre fréquemment des lésions endogènes et exogènes de l'ADN ainsi que des structures secondaires de l'ADN, qui sont capables d'induire la formation de complexes de clivage ADN-Top1 (Pourquier et al., 2002). Ces lésions et leurs effets sur la Top1 sont présentés dans la **table 6**. En général, l'accumulation des complexes de clivage ADN-Top1 par ces lésions est due à une inhibition de l'étape de religation. La religation requiert que l'hydroxyl en 5' soit précisément positionné pour attaquer et libérer le lien phosphotyrosyl en 3' (Pourquier and Pommier, 2001). Le positionnement de la base en 5' est critique pour un tel alignement, ce qui explique que la présence de sites abasiques et de mésappariements interfèrent avec la religation des Top1cc (Pourquier et al., 1999).

Table 6 : Lésions endogènes et exogènes de l'ADN capables d'induire la formation de complexes de clivage ADN-Top1.

TYPES DE LESIONS	(1)MECANISME	(2) REV	REFERENCES
<u>LESIONS ENDOGENES DE L'ADN</u>			
Mésappariements de base	T	r	(Pourquier et al., 2001)
Boucles	T	ir	(Pourquier et al., 1997)
Sites abasiques	T	ir	(Pourquier et al., 1997)
8-oxoguanine	B	r	(Leshar et al., 2002)
5-hydroxycytosine	?	r	(Leshar et al., 2002)
Cassures simple-brin	T	ir	(Pourquier et al., 1997)
Méthylation de cytosine	F+T	r	(Leteurtre et al., 1994)
Formation d'une triple hélice	F+T	r	(Antony et al., 2005)
Fragmentation apoptotique de la chromatine	B+T	ir	(Sordet et al., 2003 ; Sordet et al., 2004b ; Sordet et al., 2004c)
<u>LESIONS EXOGENES DE L'ADN</u>			
Lésions UV	?	?	(Subramanian et al., 1998)
Cassures de l'ADN induites par les IR	T	ir	(Pourquier et al., 1997)
O ⁶ -méthylguanine	T	r	(Pourquier et al., 2001)
Adduits O ⁶ -dA-benzo[a]pyrene	T	r	(Pommier et al., 2000b)
Adduits O ⁶ -dA-benzo[a]pyrene	F	ir	(Pommier et al., 2000a)
dA-benzo[a]pyrene	T	r	(Pommier et al., 2002)
N ⁶ -Ethenoadenine	T	r	(Pourquier et al., 1998)
Adduits N ² -dG-ethyl	T	r	(Antony et al., 2004)

(1) Mécanisme de production des complexes de clivage Top1 : T : « Trapping » des complexes de clivage Top1 (inhibition de religation) ; B : augmentation de la liaison ; F : augmentation de la réaction de clivage « forward » (en avant)

(2) REV : Réversibilité des complexes de clivage Top1 : r, réversible ; ir, irréversible.

(Adapté de Pommier, 2006)

III.3.3 Stabilisation des complexes Top1-ADN dans les cellules apoptotiques

La stabilisation des complexes Top1-ADN a également été observée dans les cellules apoptotiques. Ces complexes de clivage, appelés « complexes Top1-ADN apoptotiques » ont été détectés dans différentes cellules humaines en réponse à une variété d'inducteurs d'apoptose qui par eux-mêmes ne sont pas des inhibiteurs directs de la Top1 (Ganguly et al., 2007 ; Rockstroh et al., 2007 ; Ganguly et al, 2007 ; Rockstroh et al, 2007 ; Soe et al, 2004 ; Sordet et al, 2006 ; Sordet et al, 2008a ; Sordet et al, 2004a ; Sordet et al, 2004c) (pour revues, voir Sordet et al, 2004b ; Sordet et al, 2007 ; Sordet & Solier, 2012). Les agents identifiés qui produisent des complexes TOP1-ADN apoptotiques sont indiqués dans la **Table 7**. La formation des complexes TOP1-ADN apoptotiques est

conservée chez le parasite *Leishmania donovani* (Sen et al., 2007). Ainsi, la stabilisation des complexes Top1-ADN semble être un processus général de la mort par apoptose.

Table 7 : Agents connus pour induire des complexes Top1-ADN apoptotiques.

Agents	Cible (s) intracellulaire (s)	Références
Vinblastine Taxol Colcémide	Insertion à l'interface d'un hétérodimère de tubuline	(Rockstroh et al, 2007) ; Sordet et al, 2006)
TRAIL Fas ligand TNF- α	Active les récepteurs DR4 et DR5 à la membrane plasmique Active le récepteur Fas à la membrane plasmique Active le récepteur TNFR1 à la membrane plasmique	(Rockstroh et al., 2007; Sordet et al., 2008a)
Antimycine BH3I-2'	Mimétiques de BH3 qui se lient et inhibent l'effet anti-apoptotique de BCL-XL à la mitochondrie	(Sordet et al., 2008a)
Trioxyde d'arsenic	Induit l'accumulation intracellulaire de radicaux libres de l'oxygène	(Sordet et al., 2004b)
Staurosporine	Inhibiteur de protéines kinases: Chk1, Chk2, PDK1, PKC	(Ganguly et al., 2007; Sen et al., 2007; Sordet et al., 2004a)
UV radiation	Production de dimères de pyrimidine, de photoproduits (6-4) et de lésions oxydatives	(Soe et al., 2004)

La formation des complexes Top1-ADN est associée au programme apoptotique. D'après le modèle actuel, les complexes Top1-ADN sont préférentiellement formés par la Top1 clivée par la caspase-3 et stabilisée sur l'ADN à proximité de bases oxydées produites par les radicaux libres de l'oxygène au cours de l'apoptose; ces radicaux étant générés par les mitochondries par un mécanisme dépendant des caspases (**Figure 22**) (Sordet et al., 2008a ; Sordet and Solier, 2012). Des expériences de déplétion de Top1 par siRNA et shRNA suggèrent que les complexes TOP1-ADN participent aux modifications nucléaires associées à l'apoptose incluant la fission nucléaire et la libération de corps apoptotiques dans l'espace intercellulaire (Sordet et al., 2008a). Ces observations soulèvent la possibilité que la Top1 puisse participer au programme apoptotique en favorisant la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques.

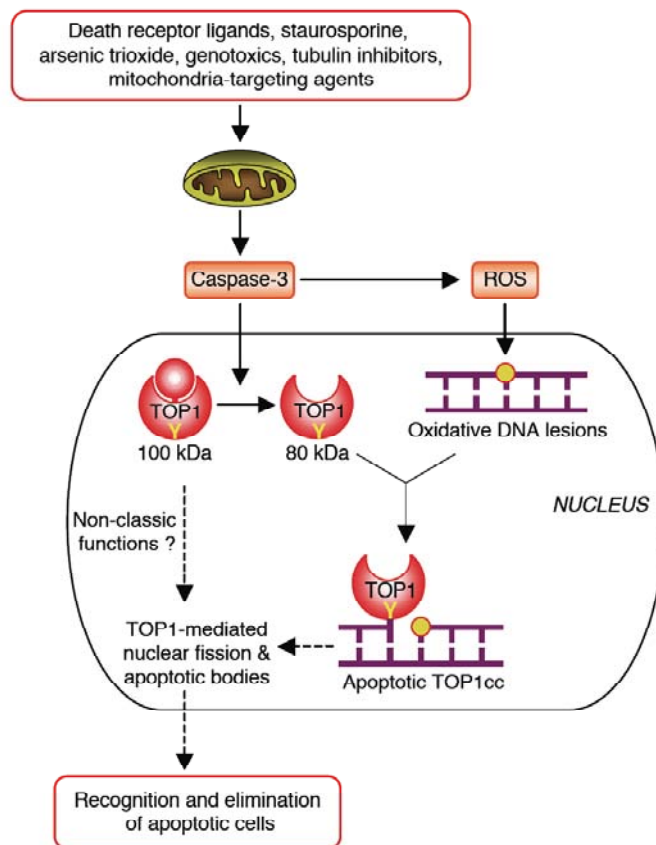


Figure 22 : Voies moléculaires proposées pour la formation des complexes Top1-ADN apoptotiques.

La plupart des stimuli apoptotiques activent la voie mitochondriale de l'apoptose entraînant l'activation de la caspase-3 et l'accumulation de ROS. La caspase-3 activée clive la Top1 et augmente la génération de ROS qui produisent des lésions oxydatives de l'ADN (8-oxoguanine, sites abasiques et cassures). La Top1 clivée par la caspase-3 est stabilisée sur l'ADN à proximité de lésions oxydatives et forme des complexes Top1-ADN apoptotiques. La tyrosine 723 de la Top1 (Y723) qui se lie de façon covalente à l'ADN est indiquée en jaune. Ces complexes pourraient participer aux modifications nucléaires associées à l'apoptose incluant la fission nucléaire et la libération de corps apoptotiques dans l'espace intercellulaire et pourraient ainsi contribuer à la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Il est possible que ces événements apoptotiques puissent dépendre des fonctions non classiques de la Top1, indépendamment de son activité catalytique.

(D'après Sordet and Solier, 2012)

III.4 Dommages à l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomerase I

Les complexes Top1-ADN réversent rapidement après le retrait de la camptothécine du milieu de culture et des expositions courtes à la camptothécine (moins d'une heure) sont relativement peu cytotoxiques. Une exposition prolongée à la camptothécine est requise pour tuer les cellules, lorsque les complexes Top1-ADN réversibles sont convertis en complexes Top1-ADN irréversibles et en dommages à l'ADN par le métabolisme cellulaire, principalement la réplication et la transcription.

III.4.1 Cassures double-brin de l'ADN induites par la réplication et réponse cellulaire

La collision des fourches de réplication semble être le principal mécanisme de la cytotoxicité des camptothécines dans les cellules répliquatives. En effet, les cellules cancéreuses en culture ont tendance à être résistante à la camptothécine lorsqu'elles sont hors de la phase S (Horwitz and Horwitz, 1973 ; O'Connor et al., 1991) ou lorsque la réplication est arrêtée au moment du traitement par la camptothécine (Holm et al., 1989; Hsiang et al., 1989a).

Les complexes Top1-ADN stabilisés sont convertis en cassures double-brin (DSBs) de l'ADN par "replication run-off" lorsque le brin leader est répliqué jusqu'au dernier nucléotide en 5' d'un complexe Top1-ADN (**figure 23**). Un autre modèle a été proposé où les DSBs sont produites par le clivage par l'endonucléase Mus81 de super-enroulements positifs de la chromatine qui s'accumulent en amont des fourches de réplication (Koster et al., 2007).

Les DSBs dépendantes de la réplication produites en réponse à la camptothécine activent une réponse « classique » incluant l'activation des kinases ATM, ATR et DNA-PK et la phosphorylation de leurs substrats comme les protéines de checkpoint Chk1 et Chk2, l'histone H2AX et p53 (Furuta et al., 2003 ; Seiler et al., 2007 ; Shao et al., 1999 ; Takemura et al., 2006) (cf chapitre II : La cassure double-brin). Des défauts dans la réponse aux DSBs entraîne généralement une hypersensibilité des cellules à la camptothécine (pour revue, voir Pommier et al., 2006).

III.4.2 Cassures double-brin de l'ADN induites par la transcription et réponse cellulaire

Les complexes Top1-ADN stabilisés par les camptothécines bloquent la progression de l'ARN polymérase II. Les complexes transcriptionnels peuvent être bloqués physiquement quelques paires de bases en amont d'un complexe Top1-DNA par l'accumulation de super-enroulement positif de la chromatine devant l'ARN polymérase II en cours de transcription (Bendixen et al., 1990 ; Mondal et al., 2003 ; Wu and Liu, 1997) (pour revue, voir Capranico et al., 2007). Il a été proposé que les complexes transcriptionnels, de manière similaire aux complexes réplicationnels, convertissent les complexes Top1-ADN réversibles en complexes Top1-ADN irréversibles et en dommages à l'ADN (Bendixen et al., 1990 ; Wu and Liu, 1997). Toutefois, dans les cellules tumorales qui sont fortement prolifératives, la transcription semble contribuer beaucoup moins que la réplication à l'activité anti-tumorale des camptothécines. C'est seulement à des fortes concentrations ($> 1 \mu\text{M}$) que la cytotoxicité des camptothécines devient indépendante de la réplication (Holm et al., 1989 ; O'Connor et al., 1991). Néanmoins, la camptothécine peut induire une apoptose transcription dépendante dans des cellules non-réplicatives comme des neurones post-mitotiques (Morris and Geller, 1996) et des fibroblastes quiescents (A. Cristini et O. Sordet, non publié).

La nature des dommages à l'ADN et des réponses cellulaires en aval induits par la transcription est moins bien caractérisée que dans le cas des dommages induits par la réplication. Il a récemment été montré que le blocage transcriptionnel par les complexes Top1-ADN stabilisés par la camptothécine entraîne la production de DSBs par un mécanisme dépendant des R-loops (**figure 23**) (Sordet et al., 2010 ; Sordet et al., 2009). Les R-loops, qui sont connus pour induire des DSBs et une instabilité génomique, sont des structures d'acide nucléique à 3 brins composées d'un hybride ARN:ADN et d'un ADN simple-brin identique à la molécule d'ARN (Aguilera and Garcia-Muse, 2012 ; Huertas and Aguilera, 2003 ; Li and Manley, 2005). Elles résultent, en amont de l'ARN polymérase II, de l'appariement de l'ARN naissant avec l'ADN matrice correspondant (Aguilera and Garcia-Muse, 2012). Les R-loops pourraient se former par l'accumulation du super-enroulement négatif, qui facilite l'ouverture des 2 brins d'ADN, derrière les complexes de transcription bloqués par les complexes Top1-ADN (Drolet et al., 2003). L'inhibition de l'activité SR-kinase de la Top1 par la camptothécine (Soret et al., 2003) pourrait également

favoriser les R-loops en interférant avec le splicing en raison d'une hypophosphorylation des protéines ASF (Li and Manley, 2005). Les DSBs co-transcriptionnelles induites par la camptothécine ont été détectées dans des neurones et des lymphocytes primaires post-mitotiques (Sordet et al., 2009 ; Zhang et al., 2011), des fibroblastes quiescents après privation de sérum (A. Cristini et O. Sordet, non publié) ainsi que dans la population hors-phase S de cellules cancéreuses (Sordet et al., 2009 ; Sakasai et al, 2010 ; Sordet et al, 2009).

Les DSBs dépendantes de la transcription produites en réponse à la camptothécine activent une réponse dépendante d'ATM et indépendante d'ATR dans les cellules post-mitotiques (Lin et al., 2008 ; Sordet et al., 2009) ainsi que dans la population hors phase-S de cellules cancéreuses (Huang et al., 2010 ; Sakasai et al., 2010). ATM activée par les DSBs transcriptionnelles phosphoryle de nombreuses protéines de la réponse aux dommages à l'ADN incluant H2AX, 53BP1, Chk2 et p53. Dans des fibroblastes quiescents traités par la camptothécine, il a été montré que DNA-PK est requis pour la localisation d'ATM activée au site des DSBs co-transcriptionnelles et pour la phosphorylation de ses substrats sur la chromatine (A. Cristini et O. Sordet, non publié). Des études complémentaires devraient révéler le rôle des DSBs co-transcriptionnelles et de la réponse ATM-dépendante en aval dans la sensibilité des cellules tumorales aux camptothécines.

La dégradation de la Top1 est une autre conséquence du blocage transcriptionnel par les complexes Top1-ADN. En réponse à la camptothécine, la Top1 est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Desai et al., 2003). La dégradation de la Top1 est sélectivement dépendante de la transcription et indépendante de la réplication (Desai et al., 2003 ; Sordet et al., 2008b). La dégradation de la Top1 est déficiente dans la plupart des cellules tumorales en comparaison avec les cellules normales. Ainsi, Liu *et al* ont proposé que la dégradation de la Top1 dans les tissus normaux pourrait agir comme un mécanisme protecteur par lequel les cellules normales s'adaptent à la camptothécine en déplaçant la Top1, alors que les cellules tumorales ne le font pas (Desai et al., 2001). Les causes de cette réponse différentielle sont très mal comprises. Il a été montré que Brca1, une protéine qui possède une activité E3 ligase (Baer and Ludwig, 2002), est impliquée dans la dégradation de la Top1 en réponse à la camptothécine (Sordet et al., 2008b). Il est possible que le défaut de dégradation de la Top1 dans les cellules cancéreuses (Desai et al., 2001)

soit en relation avec les mutations activatrices de Brca1 qui apparaissent fréquemment lors de la tumorigenèse (Fackenthal and Olopade, 2007). En plus de Brca1, l'E3 ligase cullin 3 a été impliquée dans la dégradation de la Top1 en réponse à la camptothécine (Zhang et al., 2011).

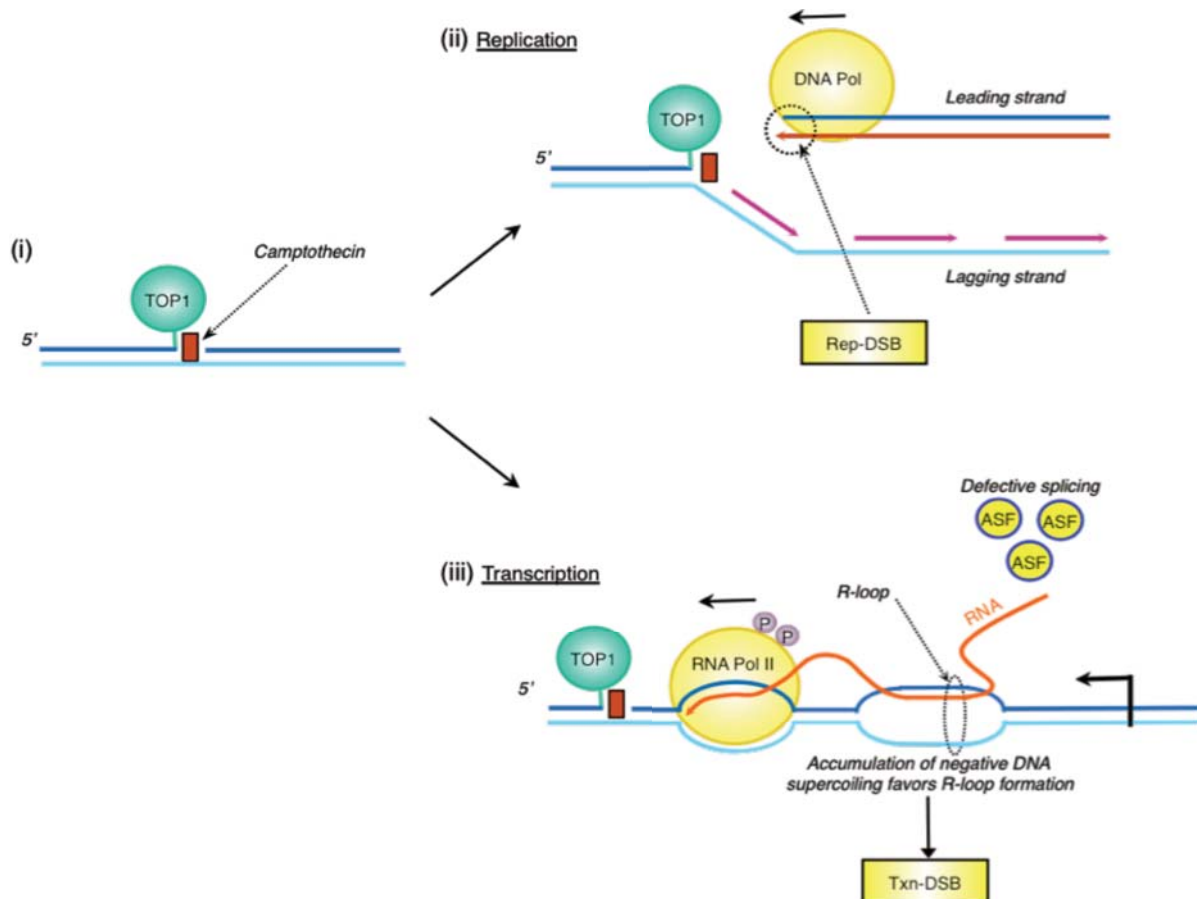


Figure 23 : Conversion des complexes Top1-ADN stabilisés par la camptothécine en DSBs lors de la réplication et la transcription.

(i) Représentation schématique d'un complexe Top1-ADN trappé par la camptothécine. La Top1 crée une liaison covalente avec l'extrémité 3' de l'ADN clivée. (ii) Lorsqu'un complexe Top1-ADN est sur le brin leader (bleu foncé) pour la synthèse d'ADN, l'ADN polymérase synthétise le brin leader naissant (rouge) jusqu'au dernier nucléotide en 5' du complexe Top1-ADN, générant ainsi une cassure double-brin répllicationnelle (Rep-DSB). (iii) Lorsqu'un complexe Top1-ADN est sur le brin transcrit, l'ARN polymérase II arrête l'élongation de l'ARN naissant (orange) et devient hyperphosphorylée. Un hybride ARN:ADN (R-loop) se forme derrière l'ARN polymérase II arrêtée en transcription générant une cassure double-brin transcriptionnelle (Txn-DSB). L'accumulation du super-enroulement négatif derrière l'ARN polymérase II et l'inhibition de l'activité SR-kinase de la Top1 par la camptothécine pourraient favoriser la formation de R-loops (pour revues, voir (Pommier, 2006; Sordet et al., 2010) (d'après Sordet and Solier, 2012).

RESULTATS

ARTICLE

« Chk2-dependent induction of RhoB facilitates γ -H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair »

Kenza Mamouni, Agnese Cristini, Sylvie Monferran, Anthony Lemarié, Jean-Charles Faye, Gilles Favre, Olivier Sordet.

RhoB est surexprimée et activée en réponse à divers génotoxiques bien que les mécanismes d'induction et la relevance fonctionnelle de cette induction restent mal compris. RhoB possède également des propriétés de suppresseur de tumeurs. Son expression diminue lors de la progression tumorale et la perte de RhoB favorise la prolifération cellulaire et l'invasion.

Pour étudier le rôle de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN et son implication potentielle dans la progression tumorale, nous avons utilisé la camptothécine (CPT), un inhibiteur sélectif de la topoisomérase I qui produit des cassures double-brin (DSBs) de l'ADN. Nous montrons que :

1- Dans les cellules traitées par la CPT, les DSBs induisent l'expression de RhoB par un mécanisme qui dépend de Chk2 et de son substrat HuR qui se lie à l'ARNm de RhoB et prévient sa dégradation.

2- Des cellules déficientes en RhoB présentent un défaut de déphosphorylation de γ H2AX après le retrait de la CPT, suggérant un défaut de réparation des DSBs.

3- Les cellules déficientes en RhoB présentent également une diminution de l'activité de la PP2A, une phosphatase pour γ H2AX et d'autres protéines de la signalisation et de la réparation des dommages à l'ADN.

Nous proposons que les DSBs activent une voie Chk2-HuR-RhoB qui favorise la déphosphorylation de γ H2AX par PP2A. Enfin, nous montrons que les cellules déficientes en RhoB accumulent du γ H2AX endogène et des anomalies chromosomiques, suggérant que la perte de RhoB augmente l'instabilité génomique induite par les DSBs et la progression tumorale.

Chk2-dependent induction of RhoB facilitates γ H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair

Kenza Mamouni¹, Agnese Cristini¹, Sylvie Monferran^{1,2}, Anthony Lemarié^{1,2}, Jean-Charles Faye¹, Gilles Favre^{1,2,3,4}, Olivier Sordet^{1,3,4}

¹Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR1037, Institut Claudius Regaud, 31052 Toulouse, France. ²Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse 3, Toulouse, 31062 France.

³Corresponding authors: Olivier Sordet: olivier.sordet@inserm.fr ; or Gilles Favre: favre.gilles@claudiusregaud.fr

⁴Equal contribution

Character count: 27,951

Running title: RhoB-induced γ H2AX dephosphorylation

SUMMARY

Unlike other Rho GTPases, RhoB is rapidly induced by DNA damage and its expression decreases during cancer progression. Because inefficient repair of DNA double-strand breaks (DSBs) can lead to cancer, we investigated whether camptothecin (CPT), an anticancer drug that produces DSBs, induces RhoB expression, and examined its role in the CPT-induced DNA damage response. We show that, in CPT-treated cells, DSBs induce RhoB expression by a mechanism that depends on Chk2 and its substrate HuR that binds to and protects RhoB mRNA against degradation. RhoB deficient cells fail to dephosphorylate γ H2AX following CPT removal indicating defective DSB repair. These cells also show decreased activity of PP2A, a phosphatase for γ H2AX. Thus, we propose that DSBs activate a Chk2-HuR-RhoB pathway that promotes PP2A-mediated dephosphorylation of γ H2AX. Finally, we show that RhoB deficient cells accumulate endogenous γ H2AX and chromosomal abnormalities, suggesting that RhoB loss increases DSB-mediated genomic instability and tumor progression.

HIGHLIGHTS

- DNA double-strand breaks rapidly induce RhoB expression
- Chk2 promotes HuR to bind to and protect RhoB mRNA against degradation
- RhoB promotes PP2A-mediated dephosphorylation of γ H2AX and repair
- RhoB deficient cells accumulate endogenous γ H2AX foci and chromosomal abnormalities

INTRODUCTION

RhoB is a small GTPase from the Rho family of proteins implicated in various intracellular functions including actin cytoskeletal organization (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Besides its well-established roles, RhoB emerged as an early DNA damage-inducible gene. RhoB is readily induced in response to various genotoxics including UV and cisplatin (Canguilhem *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 1995) although the molecular mechanisms of induction and functional relevance remain unclear. RhoB also differs from other Rho proteins, as it possesses tumor suppressor functions. RhoB expression decreases during the progression of various tumors and loss of RhoB promotes cell proliferation, invasion and metastasis (Bousquet *et al.*, 2009; Huang and Prendergast, 2006).

DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most severe lesions and their inefficient repair can initiate genomic instability, ultimately leading to cancer (Bonner *et al.*, 2008; Harper and Elledge, 2007). DSB repair requires the recruitment of DNA damage response (DDR) proteins in the vicinity of damaged chromatin (Lukas *et al.*, 2011). The serine/threonine kinases ATM, ATR and DNA-PK are readily activated by DSBs and phosphorylate various DDR proteins including histone H2AX and checkpoint kinase 2 (Chk2). Phosphorylation of these proteins is critical for efficient DDR and repair. These phosphorylations are reversible and taking out by specific serine/threonine phosphatases including PP2A, PP4, PP1, PP6 and Wip1 (Freeman and Monteiro, 2010). Accumulating studies indicate that the timely dephosphorylation of DDR proteins is required for DSB repair (Chowdhury *et al.*, 2005; Kalev *et al.*, in press; Wang *et al.*, 2009).

Topoisomerase I (Top1) removes DNA torsional stress generated during replication and transcription by forming transient Top1-DNA cleavage complexes (Top1cc). The rapid resealing of Top1cc is inhibited by camptothecin (CPT) and its derivatives used to treat cancers that bind selectively at the Top1-DNA interface (Pommier, 2006). Stabilized Top1cc

interfere with the progression of replication and transcription complexes, which result in the production of DSBs (Furuta et al., 2003; Sordet et al., 2009). CPT is a sharp tool to dissect the cellular response to DSBs as it has no other target besides Top1. CPT also has the advantage of trapping Top1cc reversibly. Indeed, Top1cc reverse fully within minutes after washing out CPT (Pommier, 2006). Here we used CPT to determine whether DSBs induce RhoB and examined both the mechanisms of induction and its functional relevance.

RESULTS AND DISCUSSION

RhoB is rapidly and selectively induced in response to DSBs

Exposure of human cancer cells to 25 μ M CPT revealed a 2-fold increase of RhoB mRNA within 30 min (Figure 1A). At this CPT concentration, the levels of RhoB mRNA reached a maximum 5-fold increase after 2 h (Figure 1A). To investigate whether the induction of RhoB mRNA was dose-dependent, cells were treated for 4 h with increasing CPT concentrations. RhoB induction was clearly detected at 1 μ M and increased with CPT concentration (Figure 1B). By contrast, the two RhoB homologs RhoA and RhoC were not induced after short exposures to CPT (Figure 1C). RhoE, another member of the Rho family, has been identified as a p53-inducible gene in response to genotoxics (Ongusaha et al., 2006). The authors focused on upregulation of RhoE mRNA after long exposures to genotoxics, typically 12 h or longer. Figure 1C shows no increase in RhoE mRNA after short exposures to CPT in p53 wild-type U2OS cells, under conditions where RhoB mRNA levels reached a maximum increase.

Increase in RhoB mRNA was associated with an increase in RhoB protein that was detectable 1 h after CPT treatment (Figures 1D and 1E). Pull-down of active (GTP-bound) Rho proteins followed by immunoblotting with an anti-RhoB antibody indicated that CPT induced both total and active RhoB proteins (Figure S1A), although it is still unclear whether

these two events are connected. Under these conditions, the levels of total and active RhoA remained unchanged (Figures 1D and 1E, and Figure S1A), which is consistent with the lack of induction of RhoA mRNA after CPT treatment (Figure 1C).

Because DSBs are readily produced in CPT-treated cells (Pommier, 2006), we tested whether they could be the initiating events for RhoB induction. Figure 1D shows that the increase in RhoB protein coincided with the phosphorylation of H2AX at Ser139 (referred to as γ H2AX), a marker for DSBs (Bonner et al., 2008). To test more directly the role of DSBs, we examined whether inhibition of replication would prevent the induction of RhoB in response to 1 μ M CPT. DSBs are primarily produced during replication at low concentrations ($\leq 1 \mu$ M) of CPT (Furuta et al., 2003). The use of higher concentrations of CPT was not straightforward because transcription-dependent DSBs are also produced (Sordet et al., 2009) and inhibiting transcription can affect directly RhoB mRNA levels. Figure 1F shows that the replication inhibitor aphidicolin prevented both CPT-induced γ H2AX and RhoB mRNA, indicating that DSBs promote RhoB upregulation.

Although RhoB can be induced in cells undergoing apoptosis (Kim et al., 2010), it is unlikely that the early increase of RhoB induced by CPT resulted from the activation of apoptotic pathways. Increase of RhoB preceded from several hours the caspase-dependent cleavage of PARP (compare Figures 1A-D and Figure S1B), and was not prevented by the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk (Figure S1C). Together, these results indicate that RhoB is induced rapidly and selectively in response to CPT-induced DSBs prior to and independently of apoptosis.

HuR-dependent stabilization of RhoB mRNA in CPT-treated cells

Increase of both transcription and transcript stability has been involved in the upregulation of RhoB mRNA in UV-exposed cells (Canguilhem et al., 2005; Westmark et al., 2005). To

examine RhoB transcription, we linked its promoter to a luciferase reporter gene. Figure 2A shows that CPT did not increase luciferase activity in cells transfected with this construct, indicating that transcription is unlikely to account for the upregulation of RhoB mRNA. Next, we compared the stability of RhoB mRNA between untreated and CPT-treated cells. Experiments performed in the presence of the transcription inhibitor flavopiridol, revealed that the half-life of RhoB mRNA was greatly prolonged in CPT-treated cells (Figure 2B).

The RNA-binding protein HuR is known to bind to and stabilize target mRNAs (Brennan and Steitz, 2001). RhoB mRNA contains a HuR binding site in its 3'UTR (Glorian et al., 2011) and a constitutive HuR-RhoB mRNA interaction has been found by RNA immunoprecipitation coupled with microarray analyses (RIP-chip) (Masuda et al., 2011). To test the potential role of HuR in the enhanced stability of RhoB mRNA, we tested whether HuR inhibition affected CPT-induced RhoB mRNA. Figure 2C shows that siRNA-mediated depletion of HuR decreased the induction of RhoB mRNA. To further implicate HuR, we examined its binding to RhoB mRNA by RIP experiments. Endogenous HuR was immunoprecipitated and the levels of co-immunoprecipitated RhoB mRNA were analyzed by RT-qPCR. In untreated cells, RhoB transcripts were enriched in HuR immunoprecipitates compared with those in control (Figure 2D) indicating that HuR binds to RhoB mRNA under normal condition as expected (Masuda et al., 2011). Cellular exposure to CPT resulted in a further enrichment of RhoB mRNA in HuR immunoprecipitates, which was detected within 30 min and increased with time of CPT exposure (Figure 2D). A similar increase in HuR-RhoB mRNA interaction has been observed after short exposures to UV (Westmark et al., 2005), suggesting that HuR-dependent stabilization of RhoB mRNA is a common mechanism for the early induction of RhoB by genotoxics.

Chk2-dependent HuR-RhoB mRNA interaction in response to DSBs

Chk2 is a serine/threonine kinase readily activated by DSBs (Pommier *et al.*, 2005). Active Chk2 phosphorylates HuR with RNA recognition motifs, and modulates HuR binding to target mRNAs (Abdelmohsen *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2011). As expected, CPT induced rapid phosphorylation of Chk2 at Thr68 (Figure 2E), which reflects its activation (Pommier *et al.*, 2005). Chk2 Thr68-phosphorylation was detected 30 min after CPT treatment (Figure 2E) and coincided with the increased association of HuR to RhoB mRNA (Figure 2D).

To assess directly the involvement of Chk2, we used HCT15 cells (Chk2-deficient) stably expressing wild-type (Chk2-WT) or kinase-dead Chk2 (ChK2-KD). The levels of HuR protein were comparable in Chk2-WT and Chk2-KD cells and were unaffected by CPT treatment (Figures 2E and 2H). Figure 2F shows that HuR binding to RhoB mRNA was reduced in Chk2-KD cells compared to Chk2-WT cells in response to CPT. As a control, parental HCT15 cells (Chk2-deficient) exhibited similar induction defect in RhoB mRNA (Figure S2) as Chk2-KD cells (Figure 2G). These results led us to test whether CPT-induced RhoB was also reduced in Chk2-KD cells. The induction of RhoB mRNA (Figure 2G) and protein (Figure 2H) was defective in Chk2-KD cells treated with CPT. Both WT and Chk2-KD cells showed identical induction of γ H2AX in response to CPT (Figure 2H) indicating that the defective response of Chk2-KD cells is not caused by a decrease amount of DSBs. Thus, we propose that in CPT-treated cells, DSBs induce Chk2-dependent phosphorylation of HuR, which promotes HuR to bind to and stabilize RhoB mRNA. Other parallel pathways besides Chk2 probably also contribute to HuR-dependent stabilization of RhoB mRNA as Chk2-KD cells are not completely defective for HuR-RhoB mRNA interaction (Figure 2F) and RhoB induction (Figures 2G and 2H).

RhoB facilitates γ H2AX dephosphorylation in CPT-treated cells

To assess the potential role of RhoB in the cellular response to CPT, we compared survival of wild-type (WT) and RhoB-deficient (RhoB^{-/-}) E6-immortalized MEF cells (Figure S3A) after CPT treatment. Cells were treated with increasing concentrations of CPT and CPT sensitivity was assessed by WST-1 survival assays. Figure 3A shows that RhoB^{-/-} cells are more sensitive than WT to CPT, indicating that RhoB participates in the cellular response to CPT.

Because the cytotoxicity of CPT depends on Top1cc-induced DSBs (Pommier, 2006), we analyzed the influence of RhoB on both the formation of Top1cc and the production of DSBs. Primary cells (WT and RhoB^{-/-}; Figure S3B) were used as they normally have low γ H2AX background (Lobrich *et al.*, 2010). Our results indicated that CPT-induced Top1cc (Figure 3B) and γ H2AX levels (Figures 3C and S3C) were similar in WT and RhoB^{-/-} cells.

We therefore hypothesized that the hypersensitivity of RhoB^{-/-} cells could instead result from a defect in the repair of those DSBs. To determine kinetics of DSB repair, we analyzed kinetics of γ H2AX dephosphorylation (Lobrich *et al.*, 2010). WT and RhoB^{-/-} cells were exposed to CPT for 1 h, washed, and γ H2AX dephosphorylation was followed post-CPT treatment (see protocol in Figure 3D). After termination of the CPT treatment, γ H2AX levels decreased by approximately 70% within 7 h in WT cells (Figures 3E and 3F), which is consistent with kinetics and magnitude of γ H2AX foci loss after exposure to ionizing radiation (Goodarzi *et al.*, 2008). Under these conditions, γ H2AX levels were not significantly reduced in RhoB^{-/-} cells (Figures 3E and 3F). Immunofluorescence microscopy confirmed the pronounced defect of γ H2AX dephosphorylation in RhoB^{-/-} cells after removal of CPT (Figure S3C). In addition, siRNA-mediated depletion of RhoB in human HCT116 cells (Figure S3D) also resulted in marked reduction of γ H2AX dephosphorylation after removal of CPT (Figure 3G). Analysis of endogenous Top1cc showed that they reversed efficiently in both WT and RhoB^{-/-} cells after removal of CPT (Figure S3E). Thus, it is unlikely that the

persistent γ H2AX signal in RhoB^{-/-} cells simply resulted from the further production of DSBs after termination of the CPT treatment. These results indicate that RhoB promotes γ H2AX dephosphorylation in CPT-treated cells, which reflects DSB repair.

RhoB-deficient cells are defective for PP2A activity

Several serine/threonine phosphatases (PP2A, PP4, PP1, PP6, and Wip1) participate in the dephosphorylation of γ H2AX (Freeman and Monteiro, 2010). Although the exact contribution of each of them is unclear, PP2A seems the main phosphatase for γ H2AX in response to CPT (Chowdhury et al., 2005). PP2A inhibition induces persistent γ H2AX and DSBs in CPT-treated cells and increases cellular sensitivity to CPT (Chowdhury et al., 2005), similar effects to those observed in RhoB-deficient cells (Figures 3A to 3G). We therefore examined whether RhoB inhibition could affect PP2A activity.

Consistent with the prevalent role of PP2A for removing γ H2AX in CPT-treated cells (Chowdhury et al., 2005), inhibition of PP2A with fostriecin or okadaic acid completely prevented γ H2AX dephosphorylation following removal of CPT (Figure 3H). Next, we measured PP2A activity in WT, RhoB^{-/-}, and RhoB^{-/-} cells complemented with HA-RhoB. The levels of PP2A(C) protein were similar in all cell populations (Figure 3I). Figure 3J shows that PP2A activity was reduced in RhoB^{-/-} cells compared to WT and RhoB^{-/-} cells complemented with HA-RhoB. Although PP2A(C) can bind to RhoB (Lee et al., 2007), it is unclear whether this interaction is important for PP2A activity. Further studies will be required to determine how RhoB expression stimulates PP2A activity.

It is now well documented that inhibition of PP2A activity impairs DSB repair (Chowdhury et al., 2005; Kalev et al., in press; Wang et al., 2009). PP2A may stimulate DSB repair by the timely dephosphorylation of other DDR proteins besides γ H2AX. In response to CPT, PP2A dephosphorylates Ku and DNA-PKcs, which enhances the formation of

Ku/DNA-PKcs complex and facilitates DSB repair by non-homologous end-joining (Wang et al., 2009). PP2A dephosphorylates also ATM, RPA, Chk2 and Chk1 (Freeman and Monteiro, 2010) although it is still unclear whether their dephosphorylation is important for repair. PP2A may also stimulate DSB repair by dephosphorylating non-DDR proteins such as Akt1 (Kuo et al., 2008). Indeed, phosphorylated/active Akt1 has been reported to inhibit homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of Brca1 and Rad51 (Plo et al., 2008). It is therefore possible that RhoB inhibition prevents DSB repair by inhibiting the PP2A-dependent dephosphorylation of Akt1. This hypothesis is concordant with our previous finding that loss of RhoB expression promotes activation of Akt1 (Bousquet et al., 2009). Whatever the mechanism for PP2A to promote DSB repair, our finding that RhoB-deficient cells are defective for PP2A activity links RhoB expression to DSB repair.

RhoB-deficient cells reveal endogenous γ H2AX foci and genomic instability

We therefore examined whether RhoB-deficient cells would accumulate endogenous DSBs. We analyzed γ H2AX nuclear foci by immunofluorescence microscopy in WT and RhoB^{-/-} cells in the absence of treatment. This technique is highly sensitive as it can detect a single DSB focus per cell (Bonner et al., 2008). Figure 4A revealed elevated γ H2AX foci in RhoB^{-/-} cells compared to WT. Quantitative analyses of the microscopy images showed that approximately 25% of RhoB^{-/-} nuclei formed more than 15 γ H2AX foci compared to 3% in WT cells (Figure 4B).

Inefficient repair of DSBs can initiate genomic instability (Bonner et al., 2008; Harper and Elledge, 2007). To evaluate genomic instability in RhoB^{-/-} cells we performed comparative genomic hybridization (CGH) whole-genome tiling arrays. Results, exemplified by chromosome 8 (Figure 4C), show amplification and deletion events that concerned approximately 0.5 % of the whole genome of RhoB^{-/-} cells compared to WT cells (Figures

4D). Together these experiments suggest that RhoB loss increases endogenous DSBs and genomic instability.

In conclusion, we propose that DSBs activate a Chk2-HuR-RhoB pathway that promotes PP2A-mediated dephosphorylation of γ H2AX and repair (Figure 4E). These findings identify RhoB as the first Rho GTPase involved in the DNA damage response (DDR). Its involvement in the DDR and repair is further supported by independent studies showing that RhoB deficient cells are hypersensitive to other genotoxics besides CPT (present study) including ionizing radiation (Ader et al., 2003) and UV (Canguilhem et al., 2005), and that RhoB^{-/-} mice are more susceptible to form tumors in response to DMBA, whose metabolites induce DNA damage (Liu et al., 2001). In addition, our observations that RhoB deficient cells have elevated endogenous DSBs and chromosomal abnormalities (Figure 4) suggest that loss of RhoB expression during tumor progression (Bousquet et al., 2009; Huang and Prendergast, 2006) could promote oncogenesis by increasing DSB-mediated genomic instability.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and chemicals. U2OS and HCT116 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HCT15 cells stably expressing wild-type Chk2 or kinase-dead Chk2 were from Yves Pommier (NIH, Bethesda, USA). MEF cells (WT and RhoB^{-/-}) and primary MDF cells (WT and RhoB^{-/-}) were established in the laboratory. CPT and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

RNA immunoprecipitation. Immunoprecipitation of HuR-associated RNAs was done as described (Glorian et al., 2011) with minor modifications. Precleared cell extracts were incubated overnight at 4°C with protein A/G-agarose beads (Sigma-Aldrich) coupled with

anti-HuR antibody (3A2; Santa Cruz). Immunoprecipitated RNAs were extracted using TRIzol LS Reagent (Invitrogen) before analysis by RT-qPCR. For details, see supplemental experimental procedures.

Reverse transcription qPCR. Total RNAs (MasterPure RNA Purification Kit; Epicentre) were subjected to reverse transcription (RT) using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Q-PCR analyses were performed on a CFX96 Real-time system device (Bio-Rad) using the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). All samples were analyzed in triplicate and β -actin was used as endogenous control in the $\Delta\Delta$ CT analysis. Primers are indicated in the supplemental experimental procedures.

Immunofluorescence microscopy of γ H2AX. Cultures of WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells were processed for immunofluorescence microscopy as described in the supplemental experimental procedures using the anti- γ H2AX antibody from Millipore (05-636).

Other materials and procedures are described in the **Supplemental Experimental Procedures**.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by the Ligue Nationale Contre le Cancer. We thank Y. Pommier for Chk2-WT and Chk2-KD HCT15 cells and for stimulating discussions, G.C. Prendergast for WT and RhoB^{-/-} mice, and A. Peyret-Lacombe and J. Cherier for preparing primary MDF cells from those mice. We also thank S. Cabantous, E. Nicolas and C.E. Redon for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A., *et al.* (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25, 543-557.
- Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2003). Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* 22, 8861-8869.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). γ H2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 957-967.
- Bousquet, E., Mazieres, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G., and Pradines, A. (2009). Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res* 69, 6092-6099.
- Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Bobby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., and Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 280, 43257-43263.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20, 801-809.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Freeman, A.K., and Monteiro, A.N. (2010). Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Commun Signal* 8, 27.
- Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. (1995). The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 270, 25172-25177.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., *et al.* (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278, 20303-20312.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 1692-1701.
- Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31, 167-177.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28, 739-745.
- Huang, M., and Prendergast, G.C. (2006). RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* 21, 213-218.
- Kalev, P., Simicek, M., Vazquez, I., Munck, S., Chen, L., Soin, T., Danda, N., Chen, W., and Sablina, A. (in press). Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition. *Cancer Res* *In press*.

- Kim, C.H., Won, M., Choi, C.H., Ahn, J., Kim, B.K., Song, K.B., Kang, C.M., and Chung, K.S. (2010). Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1182-1186.
- Kuo, Y.C., Huang, K.Y., Yang, C.H., Yang, Y.S., Lee, W.Y., and Chiang, C.W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* 283, 1882-1892.
- Lee, W.J., Kim, D.U., Lee, M.Y., and Choi, K.Y. (2007). Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics. *Proteomics* 7, 206-214.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P., and Prendergast, G.C. (2001). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* 21, 6906-6912.
- Lobrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., and Jeggo, P.A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9, 662-669.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13, 1161-1169.
- Masuda, K., Abdelmohsen, K., Kim, M.M., Srikantan, S., Lee, E.K., Tominaga, K., Selimyan, R., Martindale, J.L., Yang, X., Lehrmann, E., *et al.* (2011). Global dissociation of HuR-mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *EMBO J* 30, 1040-1053.
- Ongusaha, P.P., Kim, H.G., Boswell, S.A., Ridley, A.J., Der, C.J., Dotto, G.P., Kim, Y.B., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2006). RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol* 16, 2466-2472.
- Plo, I., Laulier, C., Gauthier, L., Lebrun, F., Calvo, F., and Lopez, B.S. (2008). AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res* 68, 9404-9412.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6, 789-802.
- Pommier, Y., Sordet, O., Rao, V.A., Zhang, H., and Kohn, K.W. (2005). Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. *Curr Pharm Des* 11, 2855-2872.
- Sordet, O., Redon, C.E., Guirouilh-Barbat, J., Smith, S., Solier, S., Douarre, C., Conti, C., Nakamura, A.J., Das, B.B., Nicolas, E., *et al.* (2009). Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep* 10, 887-893.
- Wang, Q., Gao, F., Wang, T., Flagg, T., and Deng, X. (2009). A nonhomologous end-joining pathway is required for protein phosphatase 2A promotion of DNA double-strand break repair. *Neoplasia* 11, 1012-1021.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2005). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* 24, 502-511.

LEGENDS

Figure 1. Rapid and selective increase of RhoB by CPT-induced DSBs. (A,B) RhoB mRNA was analyzed by RT-qPCR in cells treated for the indicated times with 25 μ M CPT (panel A; U2OS cells) and for the indicated CPT concentrations for 4 h (panel B; HCT15/Chk2^{WT} cells). Mean \pm SD of triplicate samples. (C) The indicated transcripts were analyzed by RT-qPCR in U2OS cells treated with 25 μ M CPT (mean \pm SD of three independent experiment). (D) Western blotting of RhoB, RhoA and γ H2AX in U2OS cells treated with 25 μ M CPT. α Tubulin: loading control. (E) Quantification of RhoB and RhoA protein levels analyzed by Western blotting in U2OS cells treated with CPT (25 μ M, 4.5 h). Mean \pm SD of three independent experiments. **, $P<0.01$; t -test. (F) HCT15-Chk2^{WT} cells were treated with the replication inhibitor aphidicolin (APD: 1 μ M, 15 min) before the addition of CPT (1 μ M, 2 h). Top panel: RT-qPCR analysis of RhoB mRNA. Mean \pm SD of three independent experiments. Asterisk denotes significant difference from CPT-treated cells without APD ($P<0.05$; t -test). Bottom panel: Western blotting of γ H2AX and H2AX. See also Figure S1.

Figure 2. Chk2- and HuR-dependent stabilization of RhoB mRNA in response to CPT.

(A) RhoB promoter activity was determined after transfection of U2OS cells with a RhoB promoter-luciferase reporter gene construct before treatment with 25 μ M CPT. Mean \pm SD of three independent experiments. Positive control (+): cells treated with trichostatin A (1 μ M, 15 h). (B) U2OS cells were left untreated (circles) or treated with CPT (25 μ M, 2 h) (squares) before the addition of the transcription inhibitor flavopiridol (FLV, 1 μ M). RhoB mRNA was analyzed by RT-qPCR and normalized to the level at the time of FLV addition, which was taken at 100% (average of two independent experiments). Half-life ($t_{1/2}$) of RhoB mRNA is indicated. (C) HCT116 cells were transfected with HuR-targeting or non-targeting (control)

siRNAs before treatment with CPT (25 μ M, 6 h). Top panel: RT-qPCR analysis of RhoB mRNA (mean \pm SD of triplicate samples). Bottom panel: Western blotting showing the efficiency of HuR silencing. α Tubulin: loading control. **(D)** Increased HuR-RhoB mRNA interaction on CPT treatment. HuR was immunoprecipitated (IP) from HCT15/Chk2^{WT} cells treated with 25 μ M CPT. Control: IP with a non-immune IgG. Co-IP RhoB mRNA was analyzed by RT-qPCR relative to β -actin mRNA in the input samples (mean \pm SD of triplicate samples). **(E)** Phosphorylation of Chk2 on Thr68 was examined by Western blotting in HCT15/Chk2^{WT} cells treated with 25 μ M CPT. Chk2 and HuR were examined in parallel. **(F)** Chk2-dependent binding of HuR to RhoB mRNA. HCT15/Chk2^{WT} and HCT15/Chk2^{KD} were treated with 25 μ M CPT for 4 h and RhoB mRNA was analyzed in HuR IPs as in **(D)**. **(G,H)** HCT15/Chk2^{WT} and HCT15/Chk2^{KD} cells were treated with 25 μ M CPT. **(G)** RhoB mRNA was analyzed by RT-qPCR (mean \pm SD of triplicate samples). **(H)** Western blotting of the indicated proteins. Phosphorylation of Chk2 on Ser516, which is an autophosphorylation site in response to DNA damage (Pommier *et al.*, 2005), was used to control Chk2 kinase activity in cells expressing WT or KD Chk2. See also Figure S2.

Figure 3. RhoB-deficient cells are defective for γ H2AX dephosphorylation after CPT removal and for PP2A activity. **(A)** WT and RhoB^{-/-} MEF cells were treated with the indicated concentration of CPT for 72 h and cell survival was analyzed by WST-1 assay (mean \pm SD of triplicate samples). **(B)** Detection of Top1 cleavage complexes (Top1cc) in WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells treated with CPT (25 μ M, 1 h). Three concentrations of genomic DNA (5, 2.5, and 1.25 μ g) were probed with an anti-Top1 antibody. **(C)** Western blotting of γ H2AX and H2AX in WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells treated with CPT (25 μ M, 1 h). **(D)** Cell treatment protocol to study γ H2AX dephosphorylation in response to CPT in panels **E** to **H**. Cells were treated with CPT for 1 h, and washed (W) and cultured in CPT-

free medium (release) for the indicated times. **(E)** Western blotting of γ H2AX and H2AX in WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells (CPT: 25 μ M). **(F)** Quantification of γ H2AX data shown in **(E)**. Mean \pm SD of three independent experiments. *, $P<0.05$; ***, $P<0.001$; *t*-test. **(G)** Western blotting of γ H2AX and H2AX in HCT116 cells transfected with RhoB-targeting or non-targeting (control) siRNAs (CPT: 1 μ M; Release: 6 h). **(H)** Western blotting of γ H2AX and H2AX in HCT15/Chk2^{WT} cells (CPT: 1 μ M; Release: 5 h). Okadaic acid (OA; 100 nM; lane 4) and fostriecin (100 nM; lane 5) were added right after CPT removal (washes). **(I,J)** Primary MDF cells of each genotype were analyzed for RhoB and PP2A(C) expression by Western blotting **(I)** and for PP2A activity after PP2A(C) IP using Thr phosphopeptide, K-R-pT-I-R-R, as a substrate. Mean \pm SD of three independent experiments. *, $P<0.05$; ***, $P<0.001$; *t*-test **(J)**. See also Figure S3.

Figure 4. RhoB loss is accompanied with increased γ H2AX and chromosomal abnormalities. **(A)** Representative images of WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells after staining for γ H2AX (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10 μ M. **(B)** Quantification of the number of γ H2AX foci per nucleus. A minimum of 500 nuclei was analyzed per cell type (mean \pm SD of three independent experiments). **(C)** CGH profile of chromosome 8 of RhoB^{-/-} compared to WT MDF cells. **(D)** Table expressing the whole-genome chromosomal amplification and deletion in RhoB^{-/-} compared to WT MDF cells analyzed by CGH array. **(E)** Proposed molecular pathways for the role of RhoB in the DDR. Grey box: PP2A promotes DSB repair by dephosphorylating γ H2AX [1] and/or other DDR and non-DDR proteins [2] (see Results and Discussion).

Figure 1

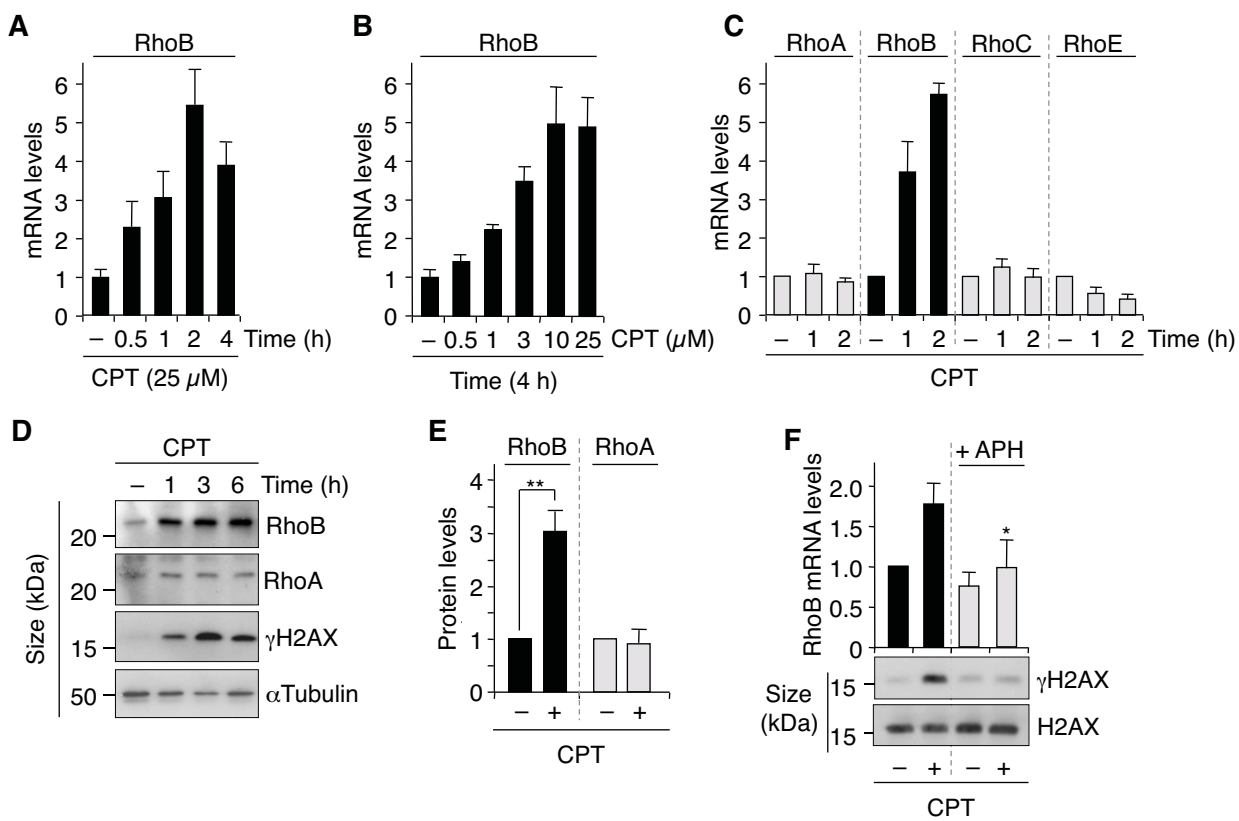


Figure 1

Figure 2

RhoB-induced γ H2AX dephosphorylation
K Mamouni *et al*

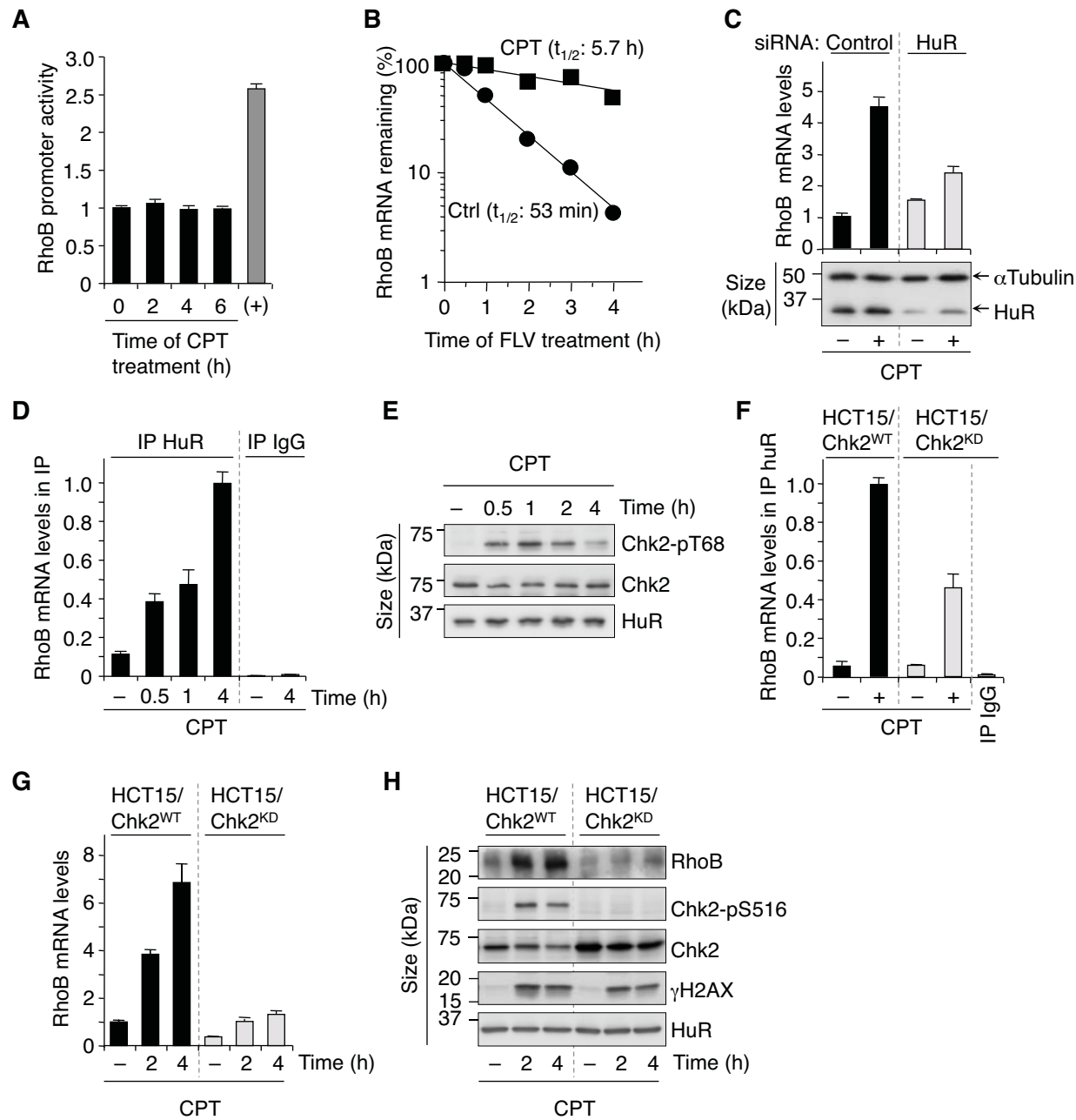


Figure 2

Figure 3

RhoB-induced γ H2AX dephosphorylation
K Mamouni *et al*

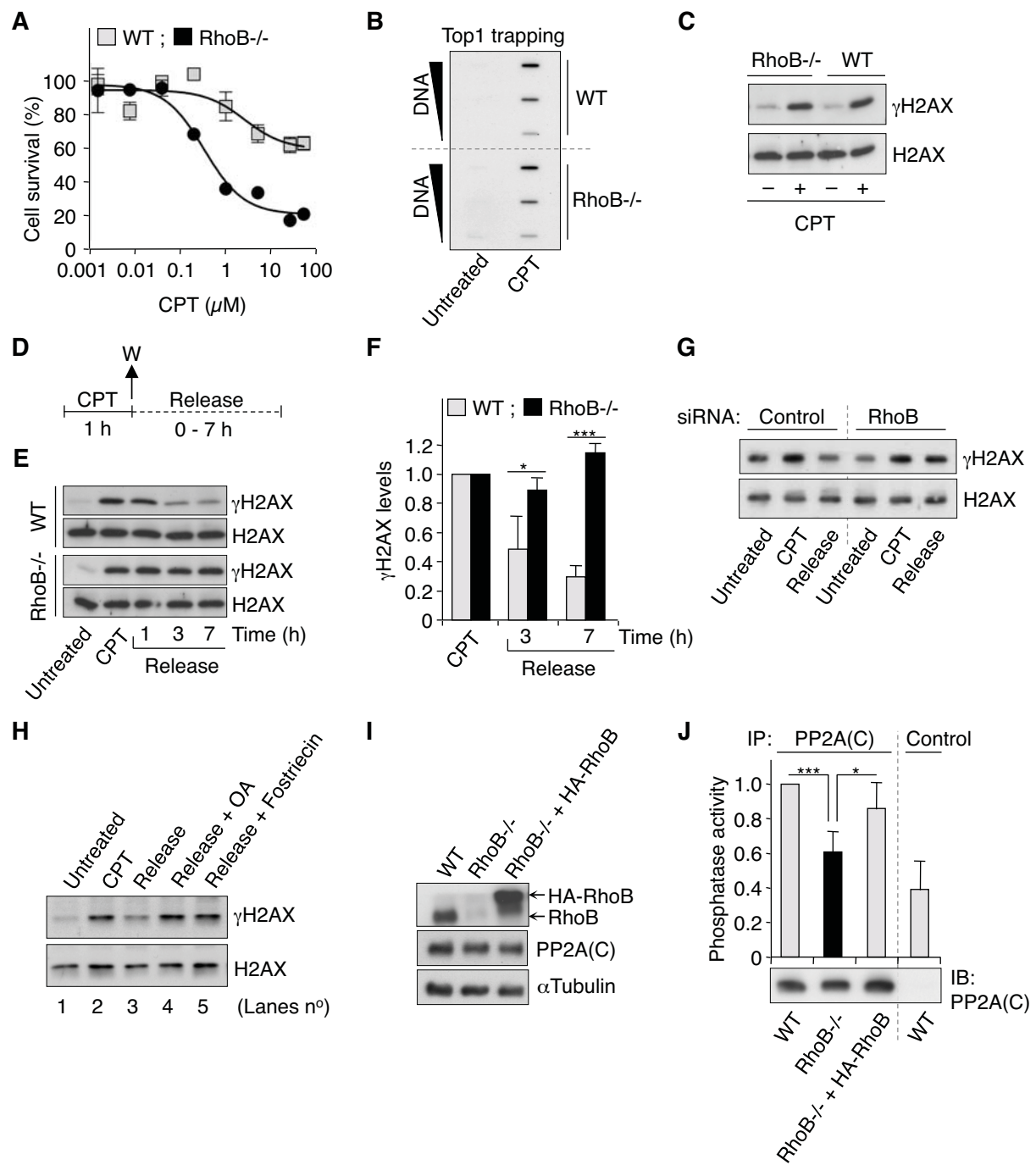


Figure 3

Figure 4

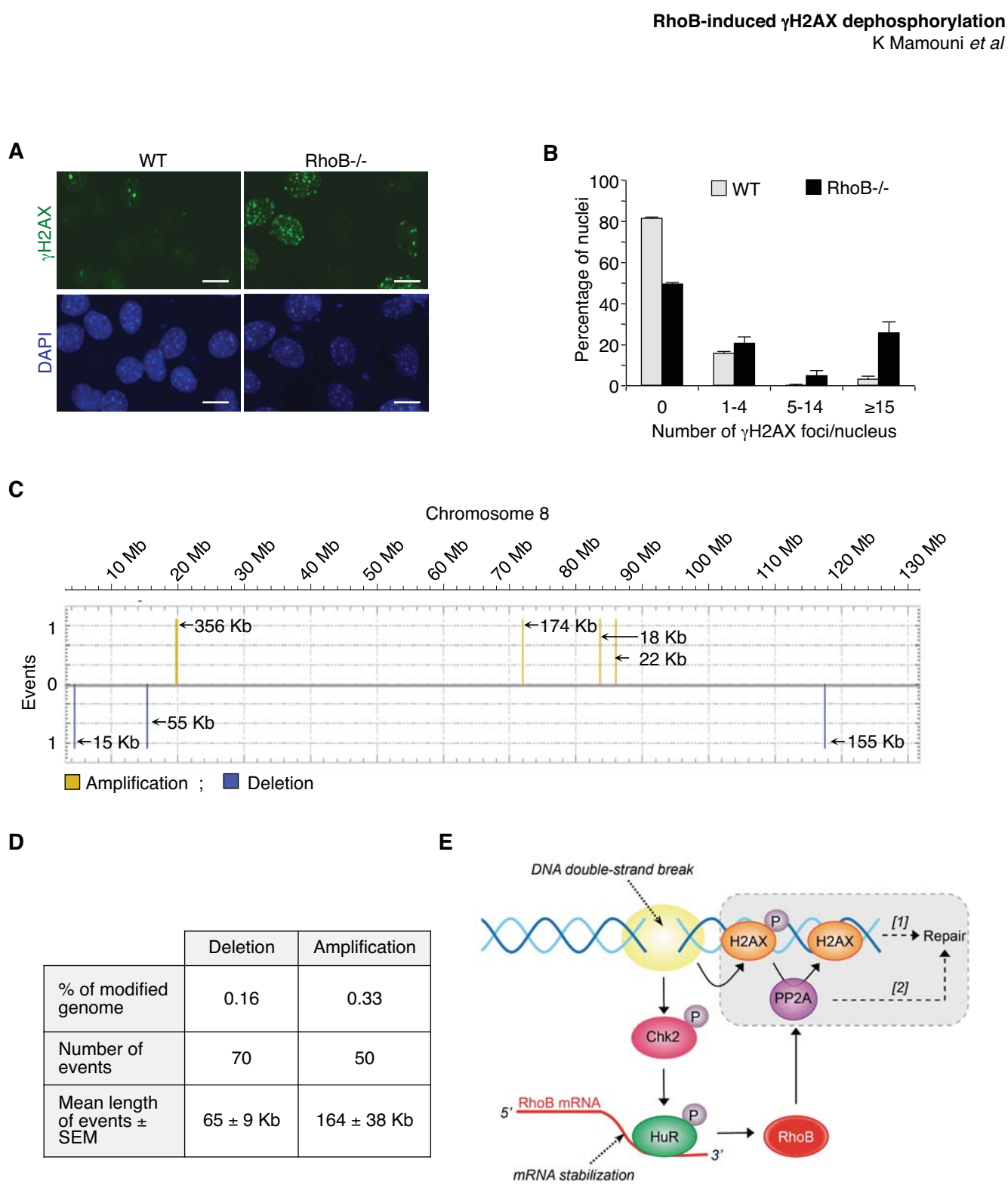


Figure 4

Inventory of Supplemental Information**Chk2-dependent induction of RhoB facilitates γ H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair**

Kenza Mamouni, Agnese Cristini, Sylvie Monferran, Anthony Lemarié, Jean-Charles Faye, Gilles Favre, Olivier Sordet

Inventory of Supplemental Figures

Figure S1 is related to Figure 1: Rapid and selective increase of RhoB by CPT-induced DSBs.

- Panel A shows that CPT induces the active form of RhoB.
- Panels B and C show that CPT-induced RhoB is independent of apoptosis.

Figure S2 is related to Figure 2: Chk2- and HuR-dependent stabilization of RhoB mRNA in response to CPT.

- Panels A and B show that HCT15 cells (Chk2-deficient) are defective for CPT-induced RhoB mRNA compared to HCT15 cells stably expressing wild-type Chk2.

Figure S3 is related to Figure 3: RhoB-deficient cells are defective for PP2A-mediated γ H2AX dephosphorylation after CPT removal.

- Panel A shows the lack of RhoB expression in RhoB^{-/-} MEF cells.
- Panel B shows the lack of RhoB expression in RhoB^{-/-} primary MDF cells.
- Panel C shows that RhoB deficiency prevents γ H2AX dephosphorylation after CPT removal by immunofluorescence microscopy.
- Panel D shows the efficiency of RhoB silencing by siRNA in HCT116 cells.
- Panel E shows that Top1 trapping and reversal are similar in WT and RhoB^{-/-} cells.

Inventory of Supplemental Experimental Procedures

- Cell cultures
- Western blotting
- RNA immunoprecipitation
- Reverse transcription qPCR
- Cell transfection (siRNAs, plasmids)
- WST-1 cell viability assays
- Protein phosphatase 2A (PP2A) activity assay
- Detection Top1 cleavage complexes (Top1cc)
- Immunofluorescence microscopy of γ H2AX
- DNA extraction and comparative genomic hybridization (CGH) array
- RhoB promoter activity
- RhoB and RhoA activity assays

Supplemental Figures

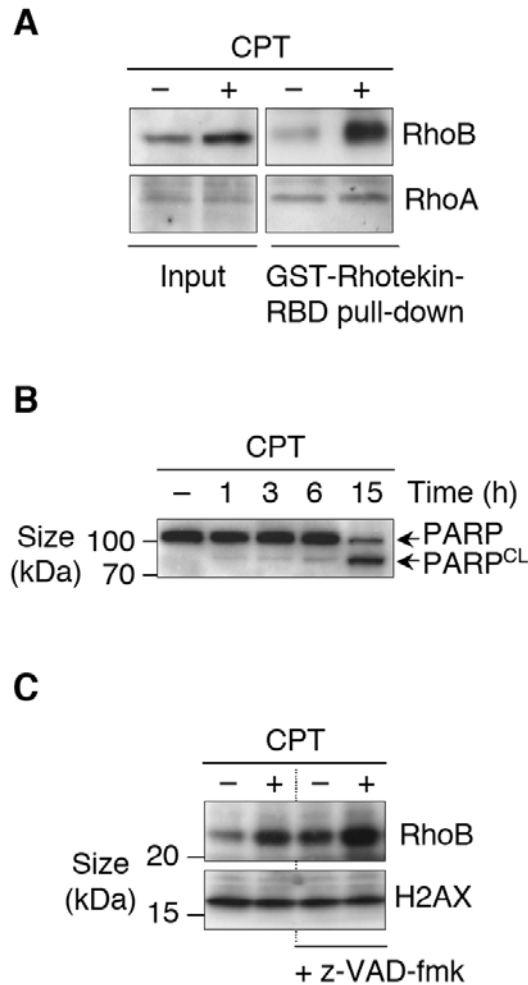


Figure S1 (related to Figure 1). (A) CPT induces the active form of RhoB. Active (GTP-bound) Rho proteins were pull-downed with GST-Rhotekin-RBD (Rho binding domain) beads in extracts from U2OS cells treated with 25 μ M CPT for 4 h. The active forms of RhoB and RhoA were detected by Western blotting with antibodies against RhoB and RhoA, respectively. Total RhoB and RhoA protein levels were examined in the extracts before GST-Rhotekin-RBD pull-down (Input). (B,C) The induction of RhoB is independent of apoptosis in CPT-treated cells. (B) Time course of caspase-mediated PARP cleavage. Western blotting of PARP in U2OS cells treated with 25 μ M CPT for the indicated times. PARP^{CL} indicates the caspase-mediated cleaved PARP fragment. PARP antibody was from Cell Signaling (Cat#9542). (C) Caspase-independent increase of RhoB expression in response to CPT. Western blotting of RhoB in U2OS cells treated with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (100 μ M; Bachem) before the addition of 25 μ M CPT for 4 h. H2AX was used as a loading control.

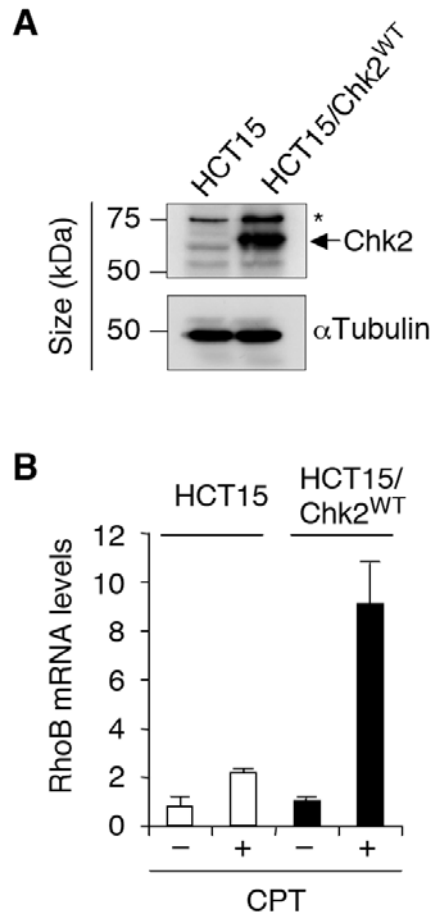


Figure S2 (related to Figure 2). Chk2 is involved in the induction of RhoB mRNA in response to CPT. **(A)** Western blotting of Chk2 in HCT15 cells (deficient for Chk2) and HCT15 cells complemented with wild-type Chk2 (HCT15/Chk2^{WT}). Asterisk denotes a non-specific band revealed with the antibody used against Chk2 (Cell Signaling; Cat#2662). α Tubulin was used as a loading control. **(B)** HCT15 and HCT15/Chk2^{WT} were treated with 25 μ M CPT for 4 h and RhoB transcripts were analyzed by RT-qPCR (means \pm SD of triplicate samples).

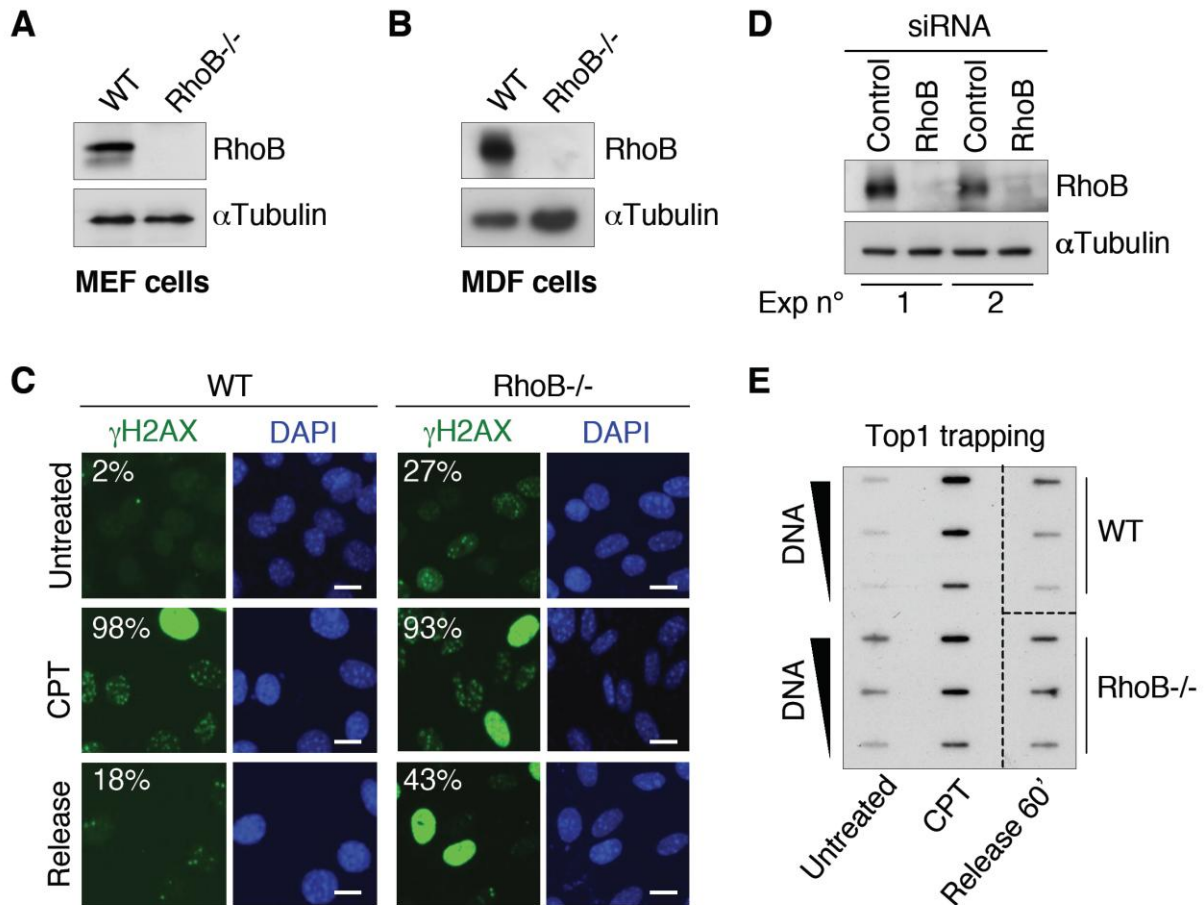


Figure S3 (related to Figure 3). (A,B) Western blotting of RhoB in WT and RhoB^{-/-} E6-immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) cells (A) and primary mouse dermal fibroblast (MDF) cells (B). α Tubulin was used as loading controls. (C) RhoB deficiency prevents γ H2AX dephosphorylation after CPT removal. WT and RhoB^{-/-} MDF cells were treated with 25 μ M CPT for 1 h, and washed (W) and cultured in CPT-free medium (release) for 7 h. Cells were stained for γ H2AX (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). The distribution of γ H2AX levels shows two groups of cells with high and low γ H2AX levels, which are replicating and non-replicating cells, respectively (Sordet et al., 2009; Zhang et al., 2011). Numbers indicate the percentage of cells with at least 5 γ H2AX foci. Scale bar, 10 μ M. (D) HCT116 cells were transfected with RhoB-targeting or non-targeting (control) siRNAs. Western blotting showing the efficiency of RhoB silencing in two independent experiments. α Tubulin was used as a loading control. The RhoB-targeting siRNAs used (target DNA sequences: GCTAAGATGGTGTATTTA) do not affect the expression of the RhoB homolog RhoA (Bousquet et al., 2009). (E) Top1 trapping and reversal are similar in WT and RhoB^{-/-} cells. Detection of Top1 cleavage complexes (Top1cc) in MDF cells treated with 25 μ M CPT for 1 h. Release 60': cells were harvested 60 min after CPT removal. Different concentrations of genomic DNA (5, 2.5, and 1.25 μ g) were probed with an anti-Top1 antibody. Dashed lines indicate that intervening wells have been spliced out.

Supplemental Experimental Procedures

Cell cultures. Human osteosarcoma (U2OS) and colon carcinoma (HCT116, HCT15) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HCT15 cells stably expressing wild-type Chk2 (Chk2-WT) or kinase-dead D347A Chk2 (Chk2-KD) were from Yves Pommier (NIH, Bethesda, USA) (Aris and Pommier, 2011; Kass et al., 2007). WT and RhoB^{-/-} E6-immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were established in the laboratory from SV129 mice obtained from G.C. Prendergast (Lankenau Institute for Medical Research, Wynnewood, USA) using the protocol described in (Liu et al., 2001). WT and RhoB^{-/-} primary mouse dermal fibroblast (MDF) cells were isolated from SKH1 mice (established in the laboratory from SV129 mice) as described (Aasen and Izpisua Belmonte, 2010) and cultured for a maximum of 9 passages. All the above cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum.

Western blotting. Whole-cell extracts were obtained by lysing cells in buffer (1% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) supplemented with protease (Complete; Roche Diagnostics) and phosphatase (Cocktail 3; Sigma-Aldrich) inhibitors. Viscosity of the samples was reduced by brief sonication and proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotted with the following antibodies: anti-Chk2 (2662; Cell Signaling), anti-Chk2-pS516 (2669; Cell Signaling), anti-Chk2-pT68 (2661; Cell Signaling), anti-H2AX (ab11175; Abcam), anti- γ H2AX (05-636; Millipore), anti-HuR (sc-5261; Santa Cruz), anti-PP2A(C) (#1512-1; Epitomics), anti-RhoA (sc-418; Santa Cruz), anti-RhoB (sc-180; Santa Cruz), and anti- α Tubulin (T5168; Sigma-Aldrich). Quantification of protein levels in Figures 1E and 3F was done using ImageJ (version 1.40g).

RNA immunoprecipitation. Immunoprecipitation of HuR-associated RNAs was done as described (Glorian et al., 2011) with minor modifications. Forty million cells were lysed for 30 min at 4°C in 750 μ l buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM KCl, 0.5% NP40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF and 0.5 mM DTT, supplemented with 0.2 U RNAsin (Promega) and protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics). After centrifugation at 10,000g for 10 min, supernatants were precleared for 30 min at 4°C with 20 μ l of protein A/G-agarose beads (Sigma-Aldrich) previously blocked for 5 h at 4°C in washing buffer (300 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 0.1% NP40) containing 5 μ g/ μ l yeast tRNA (Invitrogen), 1 μ g/ μ l acetylated BSA (Sigma-Aldrich) and protease inhibitors (Complete;

Roche Diagnostics). Beads (20 μ l) were coupled with 15 μ g of mouse anti-HuR antibody (3A2; Santa Cruz) or 15 μ g of mouse non-immune antibody (control IgG) (02-6502; Invitrogen) for 4 h at 4°C and incubated with 2 mg precleared cell lysate overnight at 4°C. After several washes in washing buffer and proteinase K (Roche Diagnostics) treatment, immunoprecipitated RNAs were extracted using TRIzol LS Reagent (Invitrogen) and treated with TurboDNase (Ambion) before reverse transcription (RT)-qPCR experiments.

Reverse transcription qPCR. Total RNAs (MasterPure RNA Purification Kit, Epicentre) were subjected to reverse transcription (RT) using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Q-PCR analyses were performed on a CFX96 Real-time system device (Bio-Rad) using the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in triplicate and β -actin was used as endogenous control in the $\Delta\Delta$ CT analysis. The primers used are *RhoA*-FW, 5'-TGG AAG ATG GCA TAA CCT GTC-3' and *RhoA*-RV, 5'-AAC TGG TGG CTC CTC TGG-3'; *RhoB*-FW, 5'-TTG TGC CTG TCC TAG AAG TG-3' and *RhoB*-RV, 5'-CAA GTG TGG TCA GAA TGC TAC-3'; *RhoC*-FW, 5'-TGT CAT CCT CAT GTG CTT CTC-3' and *RhoC*-RV, 5'-GTG CTC GTC TTG CCT CAG-3'; *RhoE*-FW, 5'-CCT GCT CCT CTC GCT CTC-3' and *RhoE*-RV, 5'-TCT GGC TGG CTC TTC TCT C-3'; and β -actin-FW, 5'-TCC CTG GAG AGG AGC TAC GA -3' and β -actin-RV, 5'-AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG -3'.

Cell transfection (siRNAs, plasmids). siRNAs: Cells were transfected with HuR- or RhoB-targeting siRNAs or non-targeting siRNAs (Eurogentec) using Oligofectamine transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Target DNA sequences: HuR (5'-GAG GCA ATT ACC AGT TTC A-3'), RhoB (5'-GCT AAG ATG GTG TTA TTT A-3'), non-targeting (5'-GAC GTG GGA CTG AAG GGG T-3'). Experiments were performed 48 h after transfection. Plasmids: cells were transfected with a plasmid encoding HA-RhoB (Lajoie-Mazenc et al., 2008) using jetPEI DNA transfection reagent (Polyplus transfection) according to the manufacturer's protocol. Experiments were performed 24 h after transfection.

WST-1 cell viability assays. WT and RhoB^{-/-} MEF cells were seeded in triplicate into 96-well microplate at a density of 1,000 cells per well. Twenty-four hours after plating, cells were treated with various concentrations of CPT (from 1.6 nM to 50 μ M) and cultured for 72

h. Then, the WST-1 reagent (Roche Diagnostics) was applied for 1 h at 37°C. The formazan dye was quantified at 450 nm by using a plate reader (LabSystems Multiskan). Data are expressed as the percentage of cell survival (mean \pm SD of treated cells normalized to mean \pm SD of untreated cells, which was taken at 100%).

Protein phosphatase 2A (PP2A) activity assay. PP2A activity was assayed using a PP2A immunoprecipitation phosphatase assay kit (Upstate) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were lysed on ice in phosphatase extraction buffer (20 mM imidazole-HCl pH 7.0, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cell lysate (500 μ g) was incubated for 2 h at 4°C with protein A-agarose beads coupled with 4 μ g of mouse anti-PP2A-C antibody (clone 1D6; Upstate) or mouse non-immune antibody (control IgG) (02-6502; Invitrogen). Phosphatase activity was assayed by incubating the immunoprecipitated proteins with the synthetic threonine phosphopeptide, K-R-pT-I-R-R, at 30°C for 10 min prior to detection with malachite green phosphate detection solution. After 15 min, free phosphate was quantified by measuring absorbance at 620 nm in a microplate reader. Phosphatase activity was calculated using a phosphate standard curve. All samples were analyzed in triplicate.

Detection Top1 cleavage complexes (Top1cc). Cellular Top1cc were detected as previously described (Regairaz *et al.*, 2011), except that the immunoblotting of Top1 was revealed using chemiluminescence by autoradiography.

Immunofluorescence microscopy of γ H2AX. Cultures of WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells on chamber slides (Lab-Tek; Thermo Fisher Scientific) were processed for immunofluorescence microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and post-fixed/permeabilized with ice-cold 70% ethanol overnight at 4°C. Cells were incubated with 8% bovine serum albumin (BSA) for 1 h to block non-specific binding before incubation with mouse anti- γ H2AX antibody (05-636; Millipore) diluted in 1% BSA/PBS buffer for 2 h. After washes, cells were incubated with Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse antibody (Invitrogen) diluted in 1% BSA/PBS buffer for 45 min. After washes, slides were mounted in mounting medium containing DAPI (Vectashield; Vector Laboratories) and visualized using a fluorescent microscope (ECLIPSE 90i; Nikon). Pictures were analyzed with Photoshop CS3 (Adobe).

DNA extraction and comparative genomic hybridization (CGH) array. Genomic DNA was extracted from WT and RhoB^{-/-} primary MDF cells using the QIAamp DNA Kit (Qiagen). DNA from WT and RhoB^{-/-} cells was labeled with Cy3 and Cy5 (Dual color labeling kit; Roche-Nimblegen), respectively, before hybridization on 720K whole-genome tiling arrays (Roche-Nimblegen). Slides were scanned using the MS200 scanner (Tecan) and images were analyzed using DEVA 2.1 software (Roche-Nimblegen) with segmentation and background correction. Amplification and deletion were considered as significant events when at least 5 consecutive probes were $\geq \log_2$ (amplification) or $\leq \log_2$ (deletion). Chromosome 11 was duplicated in RhoB^{-/-} cells compared to WT cells and was excluded from the analysis presented in Figure 4D.

RhoB promoter activity. U2OS cells were co-transfected with a plasmid encoding the RhoB promoter linked to the *Firefly* luciferase reporter gene and a plasmid encoding the cytomegalovirus (CMV) promoter linked to the *Renilla* luciferase reporter gene (internal control) as described (Canguilhem et al., 2005). Luciferase activities were measured 48 h after transfection using the Dual Luciferase Assay system (Promega) and results were expressed as the ratio of the activities of the *Firefly* to the *Renilla* luciferases.

RhoB and RhoA activity assays. The Rho binding domain (RBD) of rothekin, an effector of Rho proteins that selectively binds to the GTP-loaded form, was expressed as a recombinant fusion with GST in *Escherichia coli* and purified through binding to GSH-Sepharose beads. Cells (8×10^6) were lysed on ice in 800 μ l lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 10 mM DTT) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (Thermo Scientific; Halt phosphatase inhibitor cocktail). GST-TRBD beads (30 μ l) were incubated with cell lysate for 30 min at 4 °C. An aliquot from each lysate was removed as a control for equivalent input into the assay. After three washes in ice-cold washing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), bounded Rho proteins were eluted from the beads with SDS-PAGE sample buffer at 95 °C and analyzed by Western blotting with anti-RhoB (sc-180; Santa Cruz) or anti-RhoA (sc-418; Santa Cruz) antibodies.

Supplemental References

- Aasen, T., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5, 371-382.
- Aris, S.M., and Pommier, Y. (2011). Potentiation of the novel topoisomerase I inhibitor indenisoquinoline LMP-400 by the cell checkpoint and Chk1-Chk2 inhibitor AZD7762. *Cancer Res* 72, 979-989.
- Kass, E.M., Ahn, J., Tanaka, T., Freed-Pastor, W.A., Keezer, S., and Prives, C. (2007). Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456. *J Biol Chem* 282, 30311-30321.
- Lajoie-Mazenc, I., Tovar, D., Penary, M., Lortal, B., Allart, S., Favard, C., Brihoum, M., Pradines, A., and Favre, G. (2008). MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J Biol Chem* 283, 4155-4164.
- Regairaz, M., Zhang, Y.W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol* 195, 739-749.
- Zhang, Y.W., Regairaz, M., Seiler, J.A., Agama, K.K., Doroshov, J.H., and Pommier, Y. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 39, 3607-3620.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Induction de la GTPase Rnd1 en réponse aux inhibiteurs de topoisomérases.

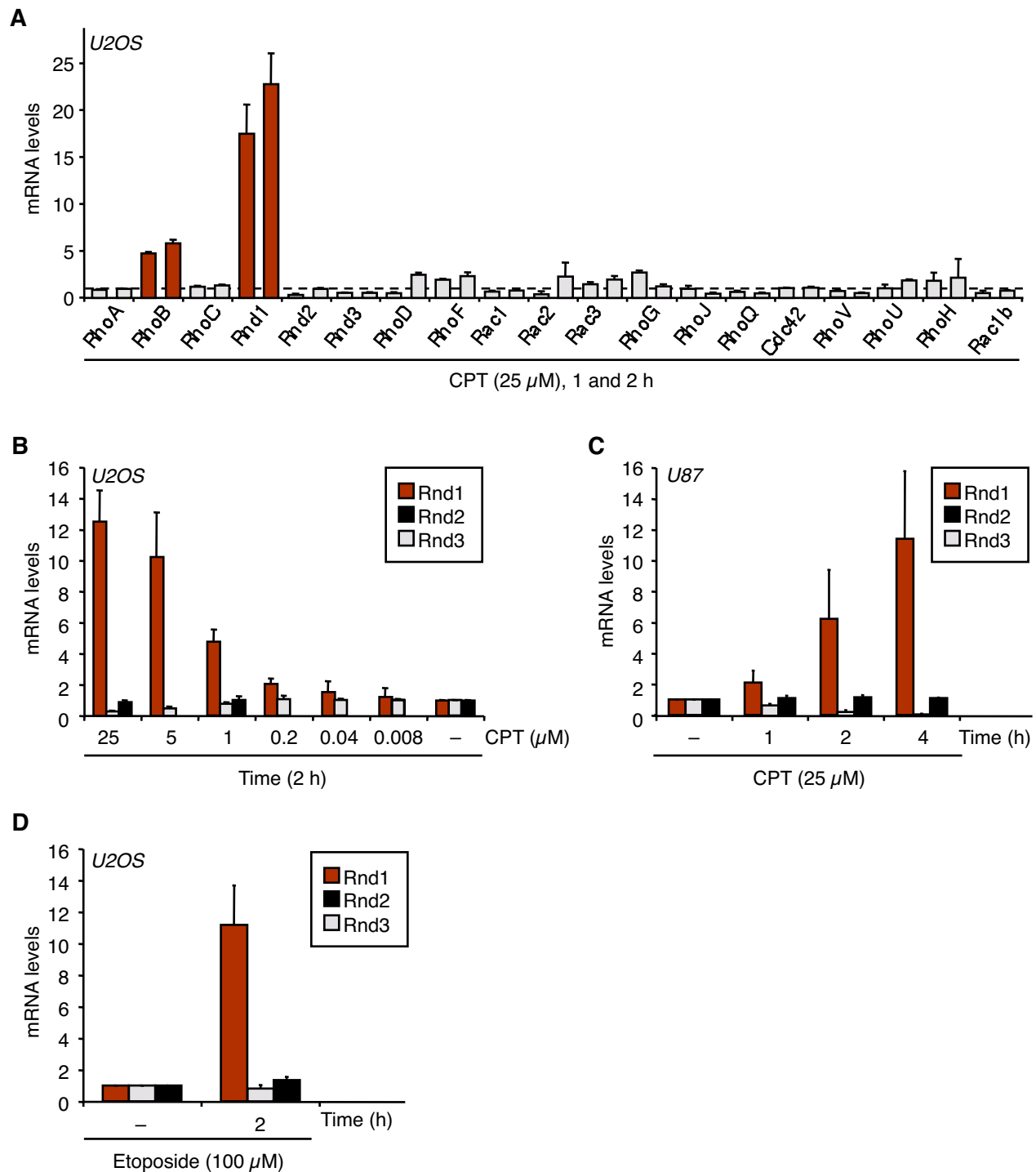
Au cours de ma thèse, j'ai analysé le taux d'ARNm des 20 GTPases Rho en réponse à la CPT. En plus de RhoB, j'ai identifié Rnd1 comme étant une autre GTPase induite en réponse à des temps précoces de traitement à la CPT. L'ARNm de Rnd1 est également induit en réponse à l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II.

La GTPase Rnd1, appartient à la famille Rnd, un sous-groupe de la famille des Rho, composé de trois protéines chez l'humain : Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 et Rnd3/Rho8/RhoE (Chardin, 2006) (**figure 1**). De par le manque d'acides aminés critiques pour l'activité GTPase, les protéines Rnd n'hydrolysent pas le GTP et de ce fait sont constitutivement liées au GTP. L'expression de Rnd1 est élevée dans le cerveau adulte et dans le foie, Rnd2 est principalement exprimée dans le cerveau et les testicules, alors que Rnd3 est plutôt ubiquitaire (Riou et al., 2010).

Rnd1 est une protéine associée aux membranes, concentrée dans les jonctions adhérentes dans les fibroblastes et les cellules épithéliales (Nobes et al., 1998). Rnd1 est surexprimée en réponse à l'IL-1 β dans des cellules endothéliales HMVEC, suggérant son implication dans la réponse cellulaire aux cytokines pro-inflammatoires (Warton et al., 2004). La structure cristalline de Rnd1 ainsi que plusieurs de ses complexes avec son effecteur Plexin ont été résolus (Wang et al., 2011). Rnd1 peut agir comme un antagoniste de RhoA en stimulant l'activité de RhoGAP p190, entraînant ainsi une diminution de la forme active de RhoA (RhoA-GTP) (Wennerberg et al., 2003).

De nombreuses fonctions ont été attribuées à Rnd1 dans la plasticité neuronale, notamment dans la régulation de la croissance neuronale et le développement dendritique (Foster et al, 1996 ; Ishikawa et al, 2003 ; Nobes et al., 1998). Chez le xénope, Rnd1 est requis d'une part pour la formation des somites (Goda et al., 2009), mais aussi dans la régulation de l'adhésion cellulaire dans les embryons (Wunnenberg-Stapleton et al., 1999). Par une approche de puce à ADN et de RT-qPCR, une étude révèle la surexpression du gène *rnd1* en réponse aux radiations ionisantes dans des lymphocytes humains (Turtoi et al., 2008).

Des expériences sont menées au laboratoire afin d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de Rnd1 en réponse aux dommages à l'ADN et de comprendre le rôle fonctionnel de cette induction.

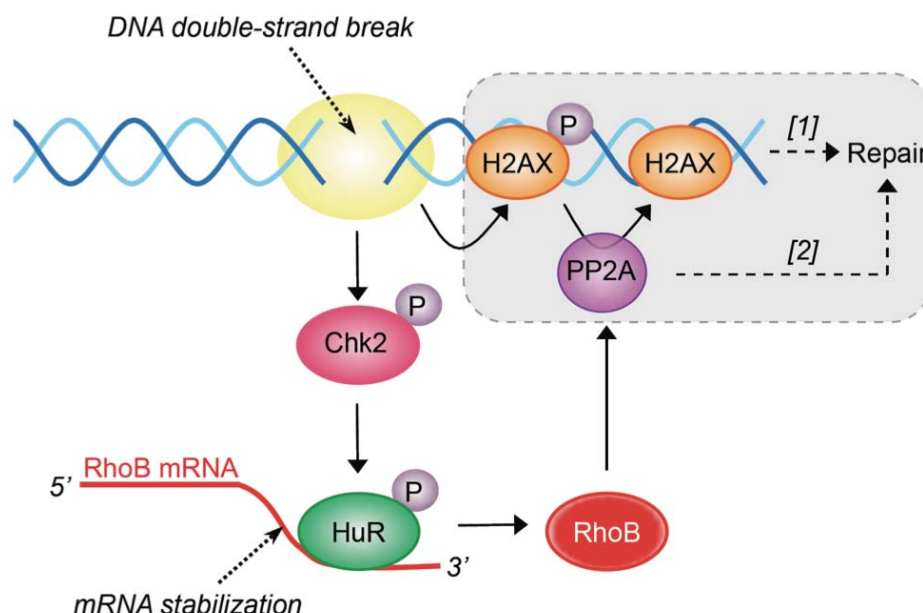


Rapid increase of Rnd1 in response to topoisomerase inhibitors. (A) mRNAs from the indicated Rho GTPases were analyzed by RT-qPCR in osteosarcoma U2OS cells treated with 25 μ M CPT. The two bars for each Rho correspond to 1 and 2 h treatment with CPT normalized to the level of untreated cells, which was taken at 1 for each Rho and represented by the dashed line. Representative experiment out of 3 (mean \pm SD of triplicate samples). (B) The indicated mRNAs were analyzed by RT-qPCR in U2OS cells treated with the indicated concentrations of CPT for 2 h. Mean \pm SD of 3 independent experiments. (C) The indicated mRNAs were analyzed by RT-qPCR in glioblastoma U87 cells treated with 25 μ M CPT for the indicated times. Mean \pm SD of 3 independent experiments. (D) The indicated mRNAs were analyzed by RT-qPCR in U2OS cells treated with 100 μ M etoposide for 2 h. Mean \pm SD of 3 independent experiments.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse, qui a consisté à étudier le rôle de la GTPase RhoB en réponse aux dommages à l'ADN induits par la camptothécine (CPT) a permis d'impliquer RhoB dans la signalisation cellulaire des cassures double-brin de l'ADN (DSBs) et suggère un rôle de RhoB dans la réparation de ces cassures. Nos résultats montrent que la CPT, un agent qui induit des DSBs et dont les dérivés solubles sont utilisés en thérapie des cancers, entraîne une surexpression précoce et spécifique de RhoB. La surexpression de RhoB passe principalement par une augmentation de la stabilité de son ARNm par la protéine de liaison aux ARNm, HuR. En réponse à la CPT, HuR se lie sur l'ARNm de RhoB et le stabilise, et ce par un mécanisme dépendant de l'activité kinase de Chk2. Aussi, des cellules déficientes en RhoB (KO, siRNA) ont non seulement un défaut de déphosphorylation de γ -H2AX après retrait de la CPT, ce qui suggère un défaut de réparation des DSBs, mais présentent aussi une diminution de l'activité de PP2A, une phosphatase pour γ -H2AX et pour d'autres protéines de la signalisation et de la réparation des cassures de l'ADN. Nous proposons que les DSBs activent une voie Chk2-HuR-RhoB qui favorise la déphosphorylation de γ -H2AX par PP2A et la réparation des DSBs (**figure 24**). Enfin, nous montrons que des cellules déficientes en RhoB (KO) présentent une augmentation du nombre de foyers γ -H2AX endogènes ainsi que des anomalies chromosomiques, témoignant d'une instabilité génomique.

Figure 24 : Modèle proposé du rôle de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN.



Implication des cassures double-brin de l'ADN dans l'induction de RhoB

Les DSBs induites par la CPT sont produites lors de la réplication (Furuta et al., 2003) et la transcription (Sordet et al., 2009). Pour déterminer si la surexpression de RhoB en réponse à la CPT est dépendante des DSBs, nous avons examiné si l'inhibition de la réplication par l'aphidicoline pouvait prévenir la surexpression de RhoB en réponse à 1 μ M de CPT. En effet, les DSBs sont principalement produites pendant la réplication à des doses relativement faibles de CPT ($\leq 1\mu$ M) (Furuta et al., 2003) et sont indépendantes de la transcription (Sordet et al., 2009). L'inhibition de la réplication par l'aphidicoline prévient l'induction de γ -H2AX et de l'ARNm de RhoB en réponse à 1 μ M de CPT (**Figure 1F de l'article**). Ces résultats suggèrent fortement que les DSBs produites en réponse à la CPT sont à l'origine de la surexpression de RhoB. En accord avec le rôle des DSBs dans l'induction de l'ARNm de RhoB, nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant que l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II qui induit des DSBs indépendamment de la réplication (Nitiss, 2009a), induit l'ARNm de RhoB (données non montrées). Nos résultats montrant l'implication de Chk2 dans l'induction de

RhoB en réponse à la CPT (**Figure 2 de l'article**) sont également en faveur de l'implication des DSBs. Il serait intéressant d'examiner l'expression de RhoB en réponse à d'autres génotoxiques connus pour induire des DSBs comme les radiations ionisantes, la doxorubicine (Duran et al., 1996), ou la bléomycine (Chen and Stubbe, 2005). Aussi, l'analyse de l'expression de RhoB dans des cellules U2OS modifiées pour induire des DSBs par l'enzyme AsiSI (Iacovoni et al., 2010) devrait permettre de déterminer plus directement le rôle des DSBs dans la surexpression de RhoB.

Rôle des kinases ATM, ATR et DNA-PK dans l'induction de RhoB

ATM, ATR et DNA-PK sont les principaux médiateurs des DSBs (Shiloh, 2006) et sont connus pour phosphoryler et activer la kinase Chk2 (Matsuoka et al., 1998 ; Matsuoka et al., 2000 ; Li and Stern, 2005) qui est impliquée dans la surexpression de RhoB (**Figure 2 de l'article**). Ces kinases sont-elles impliquées dans la surexpression de RhoB en réponse à la CPT ? Des résultats préliminaires montrent qu'un traitement à la caféine à la concentration de 2 mM, décrite pour inhiber ATM et ATR (Sarkaria et al., 1999), prévient la surexpression de RhoB en réponse à la CPT dans les cellules U2OS (donnée non montrée). En contrôle, nous avons montré que la caféine prévient la phosphorylation de Chk1 en S345 (marqueur indirecte de l'activation d'ATR) en réponse à la CPT, mais de façon inattendue ne prévient pas l'autophosphorylation d'ATM en S1981 (marqueur d'activation d'ATM) (donnée non montrée). Aussi, l'induction de RhoB en réponse à la CPT n'est pas ou peu diminuée dans des cellules KO pour ATM en comparaison avec ces mêmes cellules complémentées en ATM (donnée non montrée). Ces observations suggèrent que la surexpression de RhoB est principalement dépendante d'ATR en réponse à la CPT. D'autres expériences sont requises afin de valider ou non cette hypothèse et d'étudier aussi l'implication potentielle de DNA-PK. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité de chacune de ces kinases ATM (Hickson et al., 2004) ; DNA-PK (Leahy et al., 2004) ; ATR (Peasland et al., 2011) seuls ou en combinaison devrait permettre de répondre à ces questions.

Induction de l'expression de RhoB vs activation de RhoB

La surexpression de RhoB en réponse à la CPT est associée à la surexpression de sa forme active (RhoB-GTP) (**Figure 1D et 1E de l'article**). Cependant, ces résultats n'indiquent pas si ces deux événements sont couplés ou indépendants. Des travaux du laboratoire montrent que la surexpression de RhoB sous UVB passe par deux mécanismes : une augmentation de la forme active de RhoB (RhoB-GTP) suivie d'une augmentation de l'expression de RhoB (Canguilhem et al., 2005). En réponse à un stress génotoxique, le pool préexistant de RhoB dans la cellule serait rapidement activé afin de déclencher une réponse rapide et cette activation serait maintenue grâce à une augmentation de l'expression de RhoB (Canguilhem et al., 2005). Est-ce que le cycle RhoB-GDP/GTP peut être régulé en réponse à un stress génotoxique et notamment en réponse à la CPT ? Ce cycle est régulé par différentes classes de protéines, les GEFs, facteurs d'échanges des nucléotides, les GAPs, activateurs de l'activité GTPasique intrinsèque et les GDIs, inhibiteurs de la dissociation du GDP. Une hypothèse serait que l'activité de ces protéines soit régulée en réponse à des dommages à l'ADN. En accord avec cette hypothèse, les travaux de Srougi et BurrIDGE montrent que l'activité des GEFs nucléaires Ect2 et Net1 est augmentée en réponse à divers stress génotoxiques incluant les radiations ionisantes, le 5-FU et l'H₂O₂ (Srougi and BurrIDGE, 2011). Cependant, les mécanismes qui régulent l'activité de ces GEFs en réponse à un stress génotoxique restent à éclaircir. De manière générale, l'activation d'une GEF est régulée par sa localisation subcellulaire ainsi que par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Rossman et al., 2005). Les GEFs Ect2 et Net1 possèdent deux signaux de localisation nucléaire en N-terminal, qui leur confèrent une localisation nucléaire (Schmidt and Hall, 2002 ; Tatsumoto et al., 1999). Bien que les mécanismes d'activation de Ect2 restent à éclaircir, Ect2 peut être activée par phosphorylation pendant les phases G2/M (Tatsumoto et al., 1999). Il serait intéressant de déterminer si l'augmentation de l'activité de Ect2 en réponse aux stress génotoxiques (Srougi and BurrIDGE, 2011) est dépendante des sérine/thréonine kinases ATM, ATR et/ou DNA-PK. De façon intéressante, Ect2 contient un tandem de domaines BRCT (BRCA-1 C-terminal) en position N-terminale (Kim et al., 2005) et ATM est connue pour interagir avec bon nombre de protéines qui contiennent un domaine BRCT comme Brca1 (breast cancer gene 1). D'autre part, Net1 contient un

signal d'export nucléaire en plus des signaux d'import nucléaire, suggérant ainsi une possible relocalisation cytoplasmique de Net1 afin d'activer les protéines Rho dans le cytoplasme (Schmidt and Hall, 2002).

γ -H2AX et cassures double-brin de l'ADN

Notre étude révèle un rôle de RhoB dans la déphosphorylation de γ -H2AX après retrait de la CPT. Des études montrent que les cinétiques de disparition de γ -H2AX sont étroitement liées avec les cinétiques de réparation des DSBs de l'ADN (Bouquet et al., 2006 ; Lobrich et al., 2010). La persistance de γ -H2AX dans les cellules déplétées en RhoB (KO, siRNA) (**Figure 3d-3g de l'article**) suggère la persistance de DSBs. Un test des comètes en condition neutre ou une électrophorèse en champs pulsé devraient permettre de détecter directement la présence de DSBs.

RhoB et la phosphatase PP2A

De nombreuses phosphatases (PP2A, PP4, PP1, PP6 et Wip1) participent directement ou indirectement à la déphosphorylation de γ -H2AX (Freeman and Monteiro, 2010). Bien que l'exacte contribution de chaque phosphatase reste à être déterminée, PP2A a été décrite comme la principale phosphatase pour γ -H2AX en réponse à la CPT (Chowdhury et al., 2005). Nos résultats montrent une diminution de l'activité de PP2A de près de 40% dans les cellules RhoB^{-/-} comparées aux cellules RhoB^{+/+} (**Figures 3i et 3j de l'article**). Ces observations indiquent pour la première fois que la GTPase RhoB contrôle une activité phosphatase. Il serait intéressant de déterminer si RhoB est impliquée dans le contrôle de l'activation d'autres phosphatases comme PP4, PP1, PP6 et Wip1.

Des expériences de « pull-down » de PP2A suivies d'une électrophorèse en gel 2D couplée à une analyse protéomique ainsi que des expériences de co-immunoprécipitations montrent que la sous-unité catalytique de PP2A (PP2AC) interagit avec RhoB (Lee et al., 2007). Cependant, il reste à élucider si cette interaction est importante pour l'activité de PP2A. Chowdhury et ses collaborateurs ont montré que la sous-unité catalytique de PP2A (PP2AC) forme des foyers nucléaires qui colocalisent avec les foyers γ -H2AX en réponse à la CPT (Chowdhury et al., 2005). Par une approche biochimique, les auteurs ont

également montré la co-immunoprécipitation de PP2AC avec γ -H2AX sur la chromatine (Chowdhury et al., 2005). Ainsi, il est possible qu'en plus de maintenir l'activité de PP2A, RhoB pourrait être impliquée dans la relocalisation de PP2A aux sites des DSBs pour déphosphoryler γ -H2AX en réponse à la CPT. Actuellement, nous n'avons pas réussi à reproduire ces résultats de co-immunoprécipitation de PP2AC avec γ -H2AX et donc nous n'avons pas évalué si la diminution d'expression de RhoB influence l'association PP2AC- γ -H2AX. En parallèle, il sera intéressant de réaliser des expériences de microscopie à fluorescence afin d'analyser le rôle de RhoB sur la localisation de PP2AC dans les foyers γ -H2AX.

PP2A et réparation des cassures double-brin de l'ADN

Il est maintenant bien documenté que l'inhibition de PP2A altère la réparation des DSBs (Chowdhury et al., 2005 ; Lankoff et al., 2006 ; Wang et al., 2009 ; Kalev et al., 2012). Par exemple, il a été montré que l'inhibition de PP2A par la fostriecine, un inhibiteur sélectif de l'activité phosphatase de PP2A, ou par siRNA, entraîne une persistance des foyers γ -H2AX, un défaut de réparation des DSBs ainsi qu'une hypersensibilité des cellules en réponse à la CPT (Chowdhury et al., 2005). En plus de γ -H2AX, PP2A pourrait stimuler la réparation des DSBs par la déphosphorylation opportune d'autres protéines de la réponse aux dommages à l'ADN. PP2A déphosphoryle les protéines Ku et DNA-PKcs en réponse à la CPT, ce qui permet la formation d'un complexe Ku/DNA-PKcs fonctionnel et donc la réparation des DSBs par la voie NHEJ (Wang et al., 2009). PP2A déphosphoryle également de nombreuses protéines de réponse aux dommages à l'ADN tels que ATM, RPA, Chk2 et Chk1 mais le rôle de la déphosphorylation de ces protéines dans la réparation n'est pas connu (Freeman and Monteiro, 2010). PP2A pourrait aussi stimuler la réparation en déphosphorylant d'autres protéines que celles de la réponse aux dommages à l'ADN comme Akt (Kuo et al., 2008). En effet, la phosphorylation/activation de Akt1 inhibe la réparation des DSBs par recombinaison homologue en favorisant une rétention cytoplasmique des protéines Brca1 et Rad51 (Plo et al., 2008). La perte d'expression de RhoB pourrait ainsi empêcher la réparation des DSBs en inhibant la déphosphorylation d'Akt1 médiée par PP2A. En accord avec cette hypothèse, des résultats du laboratoire montrent que la perte d'expression de RhoB favorise l'activation d'Akt1 (Bousquet et al.,

2009). Afin d'évaluer plus directement le rôle de RhoB dans la réparation des DSBs, nous avons entrepris une collaboration avec le groupe de Bernard Lopez (IGR, Villejuif) qui est un expert dans la réparation des DSBs. Ils ont analysé les effets de la diminution d'expression de RhoB par siRNA sur la recombinaison homologue et le NHEJ dans des cellules qui expriment soit un substrat de la recombinaison homologue (Dumay et al., 2006 ; Pierce et al., 1999 ; Plo et al., 2008) soit un substrat du NHEJ (Guirouilh-Barbat et al., 2004 ; Guirouilh-Barbat et al., 2008 ; Guirouilh-Barbat et al., 2007 ; Rass et al., 2009) (cf § II.6.2 : Exemples d'outils pour étudier la réparation des cassures double-brin). Les résultats récemment obtenus de trois expériences indépendantes montrent que les cellules transfectées par siRNA RhoB présentent une diminution significative des événements de recombinaison homologue mais pas de NHEJ (non montré). Ces résultats seront inclus dans l'article. Des expériences complémentaires sont en cours afin d'examiner la fidélité de la réparation par le NHEJ (Jiang et al., 2013). D'autre part, il serait intéressant de déterminer si les cellules déficientes en RhoB présentent également un défaut de recrutement des protéines de recombinaison homologue (par exemple Brca1, Rad51) et/ou de NHEJ (par exemple 53BP1) aux sites des foyers γ -H2AX qui persistent après le retrait de la CPT.

RhoB et instabilité génomique

L'analyse des foyers γ -H2AX par microscopie à fluorescence dans des fibroblastes primaires RhoB^{+/+} et RhoB^{-/-} révèle qu'en absence de traitement, les cellules RhoB^{-/-} présentent un nombre de foyers γ -H2AX plus important que dans les cellules RhoB^{+/+} (**Figure 4a** de l'article). Ces résultats sont en accord avec le rôle de RhoB dans la déphosphorylation de γ -H2AX et suggèrent que RhoB favorise la déphosphorylation de γ -H2AX en réponse aux DSBs produites par des lésions endogènes et exogènes de l'ADN.

L'analyse quantitative des images de microscopie indique que près de 25% des noyaux de cellules RhoB^{-/-} présentent un nombre élevé de foyers γ -H2AX (**Figure 4b** de l'article). Ces observations pourraient refléter une induction de DSBs dans les cellules en phases de réplication (Rao et al., 2007). Un co-marquage γ -H2AX-BrdU par microscopie à fluorescence dans les cellules RhoB^{-/-} permettrait de répondre à cette question. Les protéines H2AX, ATM et Chk2 ont été retrouvées constitutivement phosphorylées dans des tissus cancéreux humain et plus particulièrement dans les lésions pré-cancéreuses (Bartkova et

al., 2005 ; Gorgoulis et al., 2005). Il serait intéressant d'analyser si les foyers γ -H2AX dans les cellules déficientes en RhoB colocalisent avec des foyers ATM P^{S1981} et des foyers Chk2 P^{T68}, ce qui pourrait suggérer une activation du checkpoint en réponse à ces DSBs endogènes. Aussi, comme décrit plus haut, l'analyse d'autres protéines de signalisation et de réparation des DSBs comme 53BP1, Rad51, Brca1 permettrait de déterminer si ces foyers γ -H2AX présentent des défauts dans le recrutement de protéines de réparation.

Le facteur de transcription c-Myc est un oncogène et sa surexpression contribue au développement cancéreux (Pusapati et al., 2006). La surexpression de c-Myc entraîne la formation de DSBs et empêche leur réparation (Karlsson et al., 2003 ; Pusapati et al., 2006) ; Mai et al., 1996). L'étude récente de Li et ses collaborateurs (Li et al., 2012) montre que la surexpression de c-Myc diminue l'activité de liaison des protéines Ku et de DNA-PKcs à l'ADN, ce qui résulte d'un défaut de réparation des DSBs par la voie NHEJ ainsi qu'une instabilité du génome. Ces données suggèrent que c-Myc puisse agir sur la voie de réparation des DSBs par NHEJ. Cependant, d'autres études rapportent que c-Myc peut aussi inhiber la voie de réparation des DSBs par recombinaison homologue (Karlsson et al., 2003 ; Luoto et al., 2010). De façon intéressante, RhoB contrôle le turn over de l'oncogène c-Myc en augmentant sa dégradation (Huang et al., 2006). Ainsi, une hypothèse attractive serait que la perte d'expression de RhoB au cours de la progression tumorale favorise l'accumulation nucléaire de c-Myc et prévient la réparation.

Quel que soit le mécanisme exacte par lequel RhoB régule la réparation des DSBs, nos données suggèrent pour la première fois que la perte d'expression de RhoB lors de la progression tumorale (Adnane et al., 2002a ; Forget et al., 2002 ; Mazieres et al., 2004 ; Zhou et al., 2011) pourrait favoriser l'oncogénèse en prévenant la réparation efficace des DSBs et ainsi en favorisant une instabilité génomique (Bonner et al., 2008).

REFERENCES

- Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H. and Gorospe, M. (2007a) Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle*, **6**, 1288-1292.
- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A., Furneaux, H. and Gorospe, M. (2007b) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*, **25**, 543-557.
- Adamson, P., Paterson, H.F. and Hall, A. (1992) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, **119**, 617-627.
- Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C. and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2003) Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene*, **22**, 8861-8869.
- Ader, I., Muller, C., Bonnet, J., Favre, G., Cohen-Jonathan, E., Salles, B. and Toulas, C. (2002) The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene*, **21**, 6471-6479.
- Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J.F., Prendergast, G.C. and Benjamin, L.E. (2003) RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev*, **17**, 2721-2732.
- Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S.M. and Munoz-Antonia, T. (2002a) Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*, **8**, 2225-2232.
- Adnane, J., Seijo, E., Chen, Z., Bizouarn, F., Leal, M., Sebti, S.M. and Munoz-Antonia, T. (2002b) RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem*, **277**, 8500-8507.
- Aguilera, A. and Garcia-Muse, T. (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell*, **46**, 115-124.
- Ahn, J. and Prives, C. (2002) Checkpoint kinase 2 (Chk2) monomers or dimers phosphorylate Cdc25C after DNA damage regardless of threonine 68 phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 48418-48426.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H. and Canman, C.E. (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 5934-5936.
- Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N.M., Abraham, R.T. and Wang, X.F. (2004) Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev*, **18**, 249-254.
- Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A.D., Sebti, S.M. and Favre, G. (2002) Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle*, **1**, 430-437.
- Altaf, M., Auger, A., Covic, M. and Cote, J. (2009) Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem Cell Biol*, **87**, 35-50.
- Antoni, L., Sodha, N., Collins, I. and Garrett, M.D. (2007) CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer*, **7**, 925-936.

- Antony, S., Kohlhagen, G., Agama, K., Jayaraman, M., Cao, S., Durrani, F.A., Rustum, Y.M., Cushman, M. and Pommier, Y. (2005) Cellular topoisomerase I inhibition and antiproliferative activity by MJ-III-65 (NSC 706744), an indenoisoquinoline topoisomerase I poison. *Mol Pharmacol*, **67**, 523-530.
- Antony, S., Theruvathu, J.A., Brooks, P.J., Leshner, D.T., Redinbo, M. and Pommier, Y. (2004) Enhancement of camptothecin-induced topoisomerase I cleavage complexes by the acetaldehyde adduct N2-ethyl-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res*, **32**, 5685-5692.
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S. and Allgayer, H. (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, **27**, 2128-2136.
- Baer, R. and Ludwig, T. (2002) The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 86-91.
- Baharians, Z. and Schonthal, A.H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem*, **273**, 19019-19024.
- Bahassi el, M., Myer, D.L., McKenney, R.J., Hennigan, R.F. and Stambrook, P.J. (2006) Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutat Res*, **596**, 166-176.
- Bailly, C. (2000) Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem*, **7**, 39-58.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499-506.
- Banath, J.P., Macphail, S.H. and Olive, P.L. (2004) Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res*, **64**, 7144-7149.
- Baranello, L., Bertozzi, D., Fogli, M.V., Pommier, Y. and Capranico, G. (2010) DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1 α gene locus. *Nucleic Acids Res*, **38**, 159-171.
- Barnes, D.E. and Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*, **38**, 445-476.
- Baron, R., Fourcade, E., Lajoie-Mazenc, I., Allal, C., Couderc, B., Barbaras, R., Favre, G., Faye, J.C. and Pradines, A. (2000) RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11626-11631.
- Barreau, C., Paillard, L. and Osborne, H.B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, **33**, 7138-7150.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, **3**, 421-429.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J. and Bartek, J. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**, 864-870.

- Basu, A. (2003) Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Mol Med*, **7**, 341-350.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, **272**, 19633-19636.
- Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., Birch, J.M., Li, F.P., Garber, J.E. and Haber, D.A. (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*, **286**, 2528-2531.
- Bendixen, C., Thomsen, B., Alsner, J. and Westergaard, O. (1990) Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. *Biochemistry*, **29**, 5613-5619.
- Benjamin, T.L. (2001) Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology*, **289**, 167-173.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A. and Forterre, P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414-417.
- Bishop, A.L. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 241-255.
- Blasina, A., de Weyer, I.V., Laus, M.C., Luyten, W.H., Parker, A.E. and McGowan, C.H. (1999) A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol*, **9**, 1-10.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S. and Pommier, Y. (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, **8**, 957-967.
- Bosch, M., Cayla, X., Van Hoof, C., Hemmings, B.A., Ozon, R., Merlevede, W. and Goris, J. (1995) The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. molecular cloning and developmental regulation of expression. *Eur J Biochem*, **230**, 1037-1045.
- Boswell, S.A., Ongusaha, P.P., Nghiem, P. and Lee, S.W. (2007) The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *J Biol Chem*, **282**, 4850-4858.
- Bouquet, F., Muller, C. and Salles, B. (2006) The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle*, **5**, 1116-1122.
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P. (2007) Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, **24**, 203-216.
- Bousquet, E., Mazieres, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G. and Pradines, A. (2009) Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res*, **69**, 6092-6099.
- Brennan, C.M. and Steitz, J.A. (2001) HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 266-277.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J.P. and Revy, P. (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, **124**, 287-299.
- Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*, **116**, 167-179.

- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. and Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, **17**, 1395-1413.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M. and Favre, G. (2005) RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, **280**, 43257-43263.
- Capranico, G., Ferri, F., Fogli, M.V., Russo, A., Lotito, L. and Baranello, L. (2007) The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: roles of DNA topoisomerase I. *Biochimie*, **89**, 482-489.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.H., Blanchard, K.L. and Thomas, J.E. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, **448**, 439-444.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Olaru, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C. and Nussenzweig, A. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.
- Champoux, J.J. (1981) DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine. *J Biol Chem*, **256**, 4805-4809.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Chardin, P. (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 54-62.
- Chen, J., Martin, B.L. and Brautigan, D.L. (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, **257**, 1261-1264.
- Chen, J. and Stubbe, J. (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*, **5**, 102-112.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J. and Sebti, S.M. (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem*, **275**, 17974-17978.
- Cherfils, J. and Zeghouf, M. (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, **93**, 269-309.
- Cheung, P., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, **103**, 263-271.
- Chew, Y.C., Camporeale, G., Kothapalli, N., Sarath, G. and Zemleni, J. (2006) Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase. *J Nutr Biochem*, **17**, 225-233.
- Choi, H.H., Choi, H.K., Jung, S.Y., Hyle, J., Kim, B.J., Yoon, K., Cho, E.J., Youn, H.D., Lahti, J.M., Qin, J. and Kim, S.T. (2012) CHK2 kinase promotes pre-mRNA splicing via phosphorylating CDK11(p110). *Oncogene*.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S. and Lieberman, J. (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, **20**, 801-809.

- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D.M., Weinstock, D.M., Pfeifer, G.P. and Lieberman, J. (2008) A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell*, **31**, 33-46.
- Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, **40**, 179-204.
- Cimprich, K.A. and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 616-627.
- Coleman, K.A. and Greenberg, R.A. (2011) The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *J Biol Chem*, **286**, 13669-13680.
- Come, C., Laine, A., Chanrion, M., Edgren, H., Mattila, E., Liu, X., Jonkers, J., Ivaska, J., Isola, J., Darbon, J.M., Kallioniemi, O., Thezenas, S. and Westermarck, J. (2009) CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res*, **15**, 5092-5100.
- Connolly, E.C., Van Doorslaer, K., Rogler, L.E. and Rogler, C.E. (2010) Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol Cancer Res*, **8**, 691-700.
- Connolly, E.C., Van Doorslaer, K., Rogler, L.E. and Rogler, C.E. (2010) Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol Cancer Res*, **8**, 691-700.
- Couderc, B., Pradines, A., Rafii, A., Golzio, M., Deviers, A., Allal, C., Berg, D., Penary, M., Teissie, J. and Favre, G. (2008) In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther*, **15**, 456-464.
- Croft, D.R., Crighton, D., Samuel, M.S., Lourenco, F.C., Munro, J., Wood, J., Bensaad, K., Vousden, K.H., Sansom, O.J., Ryan, K.M. and Olson, M.F. (2011) p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*, **21**, 666-682.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E. and Fernandez-Capetillo, O. (2006) ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med*, **203**, 297-303.
- de Cremoux, P., Gauville, C., Closson, V., Linares, G., Calvo, F., Tavitian, A. and Olofsson, B. (1994) EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer*, **59**, 408-415.
- de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R. and Hoeijmakers, J.H. (2000) Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*, **10**, 479-482.
- Delarue, F.L., Taylor, B.S. and Sebt, S.M. (2001) Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells. *Oncogene*, **20**, 6531-6537.
- Delmas, C., Heliez, C., Cohen-Jonathan, E., End, D., Bonnet, J., Favre, G. and Toulas, C. (2002) Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer*, **100**, 43-48.
- Desai, S.D., Li, T.K., Rodriguez-Bauman, A., Rubin, E.H. and Liu, L.F. (2001) Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res*, **61**, 5926-5932.

- Desai, S.D., Zhang, H., Rodriguez-Bauman, A., Yang, J.M., Wu, X., Gounder, M.K., Rubin, E.H. and Liu, L.F. (2003) Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol Cell Biol*, **23**, 2341-2350.
- Deweese, J.E., Burgin, A.B. and Osheroff, N. (2008) Human topoisomerase II α uses a two-metal-ion mechanism for DNA cleavage. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4883-4893.
- Dobbs, T.A., Palmer, P., Maniou, Z., Lomax, M.E. and O'Neill, P. (2008) Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 1372-1383.
- Doller, A., Huwiler, A., Muller, R., Radeke, H.H., Pfeilschifter, J. and Eberhardt, W. (2007) Protein kinase C α -dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell*, **18**, 2137-2148.
- Doller, A., Pfeilschifter, J. and Eberhardt, W. (2008) Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal*, **20**, 2165-2173.
- Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B., Xu, X. and Lees-Miller, S.P. (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol*, **30**, 1368-1381.
- Dozier, C., Bonyadi, M., Baricault, L., Tonasso, L. and Darbon, J.M. (2004) Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biol Cell*, **96**, 509-517.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Masse, E. and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, d210-221.
- Du, W. and Prendergast, G.C. (1999) Geranylgeranylated RhoB mediates suppression of human tumor cell growth by farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res*, **59**, 5492-5496.
- Dumay, A., Laulier, C., Bertrand, P., Saintigny, Y., Lebrun, F., Vayssiere, J.L. and Lopez, B.S. (2006) Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene*, **25**, 3196-3205.
- Duran, G.E., Lau, D.H., Lewis, A.D., Kuhl, J.S., Bammler, T.K. and Sikic, B.I. (1996) Differential single- versus double-strand DNA breakage produced by doxorubicin and its morpholinyl analogues. *Cancer Chemother Pharmacol*, **38**, 210-216.
- Eichhorn, P.J., Creighton, M.P. and Bernards, R. (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1795**, 1-15.
- Eng, W.K., Faucette, L., Johnson, R.K. and Sternglanz, R. (1988) Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin. *Mol Pharmacol*, **34**, 755-760.
- Fackenthal, J.D. and Olopade, O.I. (2007) Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*, **7**, 937-948.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J. and Lukas, J. (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, **410**, 842-847.
- Fellner, T., Lackner, D.H., Hombauer, H., Piribauer, P., Mudrak, I., Zaragoza, K., Juno, C. and Ogris, E. (2003) A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev*, **17**, 2138-2150.

- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P. and Neefjes, J. (2005) RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci*, **118**, 2661-2670.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A. and Nussenzweig, A. (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle*, **2**, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. and Nussenzweig, A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 959-967.
- Fillingham, J., Keogh, M.C. and Krogan, N.J. (2006) GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol*, **84**, 568-577.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Del, M., Moumdjian, R., Shedid, D., Berthelet, F. and Beliveau, R. (2002) The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin Exp Metastasis*, **19**, 9-15.
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D. and Serre, M.C. (2007) Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, **89**, 427-446.
- Freeman, A.K. and Monteiro, A.N. (2010) Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Commun Signal*, **8**, 27.
- Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M. and Kaina, B. (2002) Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, **87**, 635-644.
- Fritz, G., Gnad, R. and Kaina, B. (1999) Cell and tissue-type specific expression of Ras-related GTPase RhoB. *Anticancer Res*, **19**, 1681-1688.
- Fritz, G. and Kaina, B. (1997) rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **272**, 30637-30644.
- Fritz, G. and Kaina, B. (2001a) Ras-related GTPase Rhob represses NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, **276**, 3115-3122.
- Fritz, G. and Kaina, B. (2001b) Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res*, **29**, 792-798.
- Fritz, G., Kaina, B. and Aktories, K. (1995) The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem*, **270**, 25172-25177.
- Fujimori, A., Harker, W.G., Kohlhagen, G., Hoki, Y. and Pommier, Y. (1995) Mutation at the catalytic site of topoisomerase I in CEM/C2, a human leukemia cell line resistant to camptothecin. *Cancer Res*, **55**, 1339-1346.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner, W.M. and Pommier, Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*, **278**, 20303-20312.
- Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Martindale, J.L., Kim, H.H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J.O., Lewis, S.M., Holcik, M. and Gorospe, M. (2008) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, **28**, 93-107.
- Gampel, A., Parker, P.J. and Mellor, H. (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol*, **9**, 955-958.

- Ganguly, A., Das, B., Roy, A., Sen, N., Dasgupta, S.B., Mukhopadhyay, S. and Majumder, H.K. (2007) Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res*, **67**, 11848-11858.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J. and Khanna, K.K. (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, **278**, 14806-14811.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G. and Vagner, S. (2011) HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **18**, 1692-1701.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K. and Riou, J.F. (1996) Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, **35**, 5778-5786.
- Goda, T., Takagi, C. and Ueno, N. (2009) Xenopus Rnd1 and Rnd3 GTP-binding proteins are expressed under the control of segmentation clock and required for somite formation. *Dev Dyn*, **238**, 2867-2876.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2002) Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev*, **16**, 1739-1742.
- Gomez del Pulgar, T., Benitah, S.A., Valeron, P.F., Espina, C. and Lacal, J.C. (2005) Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*, **27**, 602-613.
- Good, P.J. (1995) A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4557-4561.
- Goodarzi, A.A., Jonnalagadda, J.C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G.B., Lees-Miller, S.P. and Khanna, K.K. (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *Embo J*, **23**, 4451-4461.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C. and Halazonetis, T.D. (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, **434**, 907-913.
- Gorospe, M. (2003) HuR in the mammalian genotoxic response: post-transcriptional multitasking. *Cell Cycle*, **2**, 412-414.
- Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B. and Kues, W. (1998) Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12370-12375.
- Goulaouic, H., Roulon, T., Flamand, O., Grondard, L., Lavelle, F. and Riou, J.F. (1999) Purification and characterization of human DNA topoisomerase IIIalpha. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2443-2450.
- Guenin, S., Schwartz, L., Morvan, D., Steyaert, J.M., Poignet, A., Madelmont, J.C. and Demidem, A. (2008) PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: a mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. *Int J Oncol*, **32**, 49-57.

- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L. and Lopez, B.S. (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell*, **14**, 611-623.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S. and Lopez, B.S. (2008) S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. *Oncogene*, **27**, 1726-1736.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20902-20907.
- Gupta, A., Sharma, G.G., Young, C.S., Agarwal, M., Smith, E.R., Paull, T.T., Lucchesi, J.C., Khanna, K.K., Ludwig, T. and Pandita, T.K. (2005) Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol*, **25**, 5292-5305.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Haluska, P., Jr., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E.W., Liu, L.F. and Rubin, E.H. (1999) Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2538-2544.
- Hautefaye, P., Cimetiere, B., Pierre, A., Leonce, S., Hickman, J., Laine, W., Bailly, C. and Lavielle, G. (2003) Synthesis and pharmacological evaluation of novel non-lactone analogues of camptothecin. *Bioorg Med Chem Lett*, **13**, 2731-2735.
- Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Stone, S.R. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry*, **29**, 3166-3173.
- Heyer, W.D., Ehmsen, K.T. and Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **44**, 113-139.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J. and Smith, G.C. (2004) Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, **64**, 9152-9159.
- Hinman, M.N. and Lou, H. (2008) Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3168-3181.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-374.
- Holm, C., Covey, J.M., Kerrigan, D. and Pommier, Y. (1989) Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res*, **49**, 6365-6368.
- Horwitz, S.B. and Horwitz, M.S. (1973) Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer Res*, **33**, 2834-2836.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **260**, 14873-14878.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G. and Liu, L.F. (1989a) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res*, **49**, 5077-5082.
- Hsiang, Y.H., Liu, L.F., Wall, M.E., Wani, M.C., Nicholas, A.W., Manikumar, G., Kirschenbaum, S., Silber, R. and Potmesil, M. (1989b) DNA topoisomerase I-

- mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res*, **49**, 4385-4389.
- Huang, M., Kamasani, U. and Prendergast, G.C. (2006) RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3. *Oncogene*, **25**, 1281-1289.
- Huang, T.H., Chen, H.C., Chou, S.M., Yang, Y.C., Fan, J.R. and Li, T.K. (2010) Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell Res*, **20**, 1060-1075.
- Huertas, P. and Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, **12**, 711-721.
- Huveneers, S. and Danen, E.H. (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, **122**, 1059-1069.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D. and Legube, G. (2010) High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *Embo J*, **29**, 1446-1457.
- Ishida, H., Zhang, X., Erickson, K. and Ray, P. (2004) Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**, 881-889.
- Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**, 1071-1078.
- Jaffe, A.B. and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 247-269.
- Jahner, D. and Hunter, T. (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **11**, 3682-3690.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
- Janssens, V., Goris, J. and Van Hoof, C. (2005) PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 34-41.
- Janssens, V., Longin, S. and Goris, J. (2008) PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci*, **33**, 113-121.
- Jaxel, C., Capranico, G., Kerrigan, D., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1991) Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *J Biol Chem*, **266**, 20418-20423.
- Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E. and Pommier, Y. (1989) Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Res*, **49**, 1465-1469.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **8**, 37-45.
- Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J.H., Yang, E., Lopez, B.S. and Xia, F. (2013) BRCA1-Ku80 Protein Interaction Enhances End-joining Fidelity of Chromosomal Double-strand Breaks in the G1 Phase of the Cell Cycle. *J Biol Chem*, **288**, 8966-8976.

- Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J.Y., Wei, S. and Sebt, S. (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol*, **24**, 5565-5576.
- Jovanovic, M. and Dynan, W.S. (2006) Terminal DNA structure and ATP influence binding parameters of the DNA-dependent protein kinase at an early step prior to DNA synthesis. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1112-1120.
- Junttila, M.R., Puustinen, P., Niemela, M., Ahola, R., Arnold, H., Bottzauw, T., Ala-aho, R., Nielsen, C., Ivaska, J., Taya, Y., Lu, S.L., Lin, S., Chan, E.K., Wang, X.J., Grenman, R., Kast, J., Kallunki, T., Sears, R., Kahari, V.M. and Westermarck, J. (2007) CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*, **130**, 51-62.
- Kalev, P., Simicek, M., Vazquez, I., Munck, S., Chen, L., Soin, T., Danda, N., Chen, W. and Sablina, A. (2012) Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition. *Cancer Res*, **72**, 6414-6424.
- Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J. and Felsher, D.W. (2003) Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9974-9979.
- Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z. and Brakebusch, C. (2009) Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1796**, 91-98.
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M. (2006) Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol*, **26**, 3295-3307.
- Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J.E., Durocher, D., Greenblatt, J.F. and Krogan, N.J. (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*, **439**, 497-501.
- Khew-Goodall, Y. and Hemmings, B.A. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **238**, 265-268.
- Kim, C.H., Won, M., Choi, C.H., Ahn, J., Kim, B.K., Song, K.B., Kang, C.M. and Chung, K.S. (2010a) Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **391**, 1182-1186.
- Kim, H.H., Abdelmohsen, K. and Gorospe, M. (2010b) Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *J Nucleic Acids*, **2010**.
- Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullmann, R., Jr., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J.L., Blethrow, J., Shokat, K.M. and Gorospe, M. (2008a) Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev*, **22**, 1804-1815.
- Kim, H.H., Yang, X., Kuwano, Y. and Gorospe, M. (2008b) Modification at HuR(S242) alters HuR localization and proliferative influence. *Cell Cycle*, **7**, 3371-3377.
- Kim, J.E., Billadeau, D.D. and Chen, J. (2005) The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis. *J Biol Chem*, **280**, 5733-5739.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. and Iliakis, G. (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5678-5694.

- Koster, D.A., Palle, K., Bot, E.S., Bjornsti, M.A. and Dekker, N.H. (2007) Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature*, **448**, 213-217.
- Koyano-Nakagawa, N., Nishida, J., Baldwin, D., Arai, K. and Yokota, T. (1994) Molecular cloning of a novel human cDNA encoding a zinc finger protein that binds to the interleukin-3 promoter. *Mol Cell Biol*, **14**, 5099-5107.
- Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J. and Lavin, M.F. (2006) Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *Embo J*, **25**, 3504-3514.
- Krogh, S., Mortensen, U.H., Westergaard, O. and Bonven, B.J. (1991) Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1235-1241.
- Kuhne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P.A. and Lobrich, M. (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res*, **64**, 500-508.
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B. and Hengst, L. (2002) ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev*, **16**, 3087-3099.
- Kuo, Y.C., Huang, K.Y., Yang, C.H., Yang, Y.S., Lee, W.Y. and Chiang, C.W. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem*, **283**, 1882-1892.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, **306**, 2084-2087.
- Kuwano, Y., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Martindale, J.L., Yang, X. and Gorospe, M. (2008) MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol Cell Biol*, **28**, 4562-4575.
- Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O. and Nebreda, A.R. (2009) p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol Cell Biol*, **29**, 4341-4351.
- Lankoff, A., Bialczyk, J., Dziga, D., Carmichael, W.W., Gradzka, I., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Piorun, I. and Wojcik, A. (2006) The repair of gamma-radiation-induced DNA damage is inhibited by microcystin-LR, the PP1 and PP2A phosphatase inhibitor. *Mutagenesis*, **21**, 83-90.
- Lavergne, O., Lesueur-Ginot, L., Pla Rodas, F., Kasprzyk, P.G., Pommier, J., Demarquay, D., Prevost, G., Ulibarri, G., Rolland, A., Schiano-Liberatore, A.M., Harnett, J., Pons, D., Camara, J. and Bigg, D.C. (1998) Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *J Med Chem*, **41**, 5410-5419.
- Leahy, J.J., Golding, B.T., Griffin, R.J., Hardcastle, I.R., Richardson, C., Rigoreau, L. and Smith, G.C. (2004) Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 6083-6087.
- Lebowitz, P.F., Du, W. and Prendergast, G.C. (1997) Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem*, **272**, 16093-16095.

- Lebowitz, P.F. and Prendergast, G.C. (1998) Functional interaction between RhoB and the transcription factor DB1. *Cell Adhes Commun*, **6**, 277-287.
- Lee, C.H. and Chung, J.H. (2001) The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *J Biol Chem*, **276**, 30537-30541.
- Lee, D.H. and Chowdhury, D. (2011) What goes on must come off: phosphatases gate-crash the DNA damage response. *Trends Biochem Sci*, **36**, 569-577.
- Lee, J.S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H. and Chung, J.H. (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, **404**, 201-204.
- Lee, W.J., Kim, D.U., Lee, M.Y. and Choi, K.Y. (2007) Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics. *Proteomics*, **7**, 206-214.
- Leshner, D.T., Pommier, Y., Stewart, L. and Redinbo, M.R. (2002) 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12102-12107.
- Leteurtre, F., Kohlhagen, G., Fesen, M.R., Tanizawa, A., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1994) Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *J Biol Chem*, **269**, 7893-7900.
- Li, J. and Stern, D.F. (2005) Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **280**, 12041-12050.
- Li, X. and Manley, J.L. (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*, **122**, 365-378.
- Li, X. and Virshup, D.M. (2002) Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*, **269**, 546-552.
- Li, Z., Owonikoko, T.K., Sun, S.Y., Ramalingam, S.S., Doetsch, P.W., Xiao, Z.Q., Khuri, F.R., Curran, W.J. and Deng, X. (2012) c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia*, **14**, 1190-1202.
- Lieber, M.R. and Wilson, T.E. (2010) SnapShot: Nonhomologous DNA end joining (NHEJ). *Cell*, **142**, 496-496 e491.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C. and Russell, P. (2007) Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell*, **28**, 134-146.
- Lin, C.P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D. and Liu, L.F. (2008) A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *J Biol Chem*, **283**, 21074-21083.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
- Liu, A., Cerniglia, G.J., Bernhard, E.J. and Prendergast, G.C. (2001a) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6192-6197.
- Liu, A. and Prendergast, G.C. (2000) Geranylgeranylated RhoB is sufficient to mediate tissue-specific suppression of Akt kinase activity by farnesyltransferase inhibitors. *FEBS Lett*, **481**, 205-208.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P. and Prendergast, G.C. (2001b) RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as

- cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 6906-6912.
- Liu, L., Rao, J.N., Zou, T., Xiao, L., Wang, P.Y., Turner, D.J., Gorospe, M. and Wang, J.Y. (2009) Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **20**, 4885-4898.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7024-7027.
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X. and Zheng, Y. (2012) Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol*, **22**, 365-373.
- Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y. and Bi, F. (2011) miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett*, **585**, 2998-3005.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuo, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. and Elledge, S.J. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, **14**, 1448-1459.
- Liu, S.K., Olive, P.L. and Bristow, R.G. (2008) Biomarkers for DNA DSB inhibitors and radiotherapy clinical trials. *Cancer Metastasis Rev*, **27**, 445-458.
- Lobrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O. and Jeggo, P.A. (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, **9**, 662-669.
- Longin, S., Jordens, J., Martens, E., Stevens, I., Janssens, V., Rondelez, E., De Baere, I., Derua, R., Waelkens, E., Goris, J. and Van Hoof, C. (2004) An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J*, **380**, 111-119.
- Longin, S., Zwaenepoel, K., Louis, J.V., Dilworth, S., Goris, J. and Janssens, V. (2007) Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem*, **282**, 26971-26980.
- Lopergolo, A., Tavecchio, M., Lisanti, S., Ghosh, J.C., Dohi, T., Favarsani, A., Vaira, V., Bosari, S., Tanigawa, N., Delia, D., Kossenkova, A.V., Showe, L.C. and Altieri, D.C. (2012) Chk2 phosphorylation of survivin-DeltaEx3 contributes to a DNA damage-sensing checkpoint in cancer. *Cancer Res*, **72**, 3251-3259.
- Lopez de Silanes, I., Fan, J., Yang, X., Zonderman, A.B., Potapova, O., Pizer, E.S. and Gorospe, M. (2003) Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene*, **22**, 7146-7154.
- Lopez-Contreras, A.J. and Fernandez-Capetillo, O. (2010) The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 1249-1255.
- Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J. and Bartek, J. (2001) DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res*, **61**, 4990-4993.
- Lukas, J., Lukas, C. and Bartek, J. (2011) More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol*, **13**, 1161-1169.
- Luoto, K.R., Meng, A.X., Wasylshen, A.R., Zhao, H., Coackley, C.L., Penn, L.Z. and Bristow, R.G. (2010) Tumor cell kill by c-MYC depletion: role of MYC-regulated genes that control DNA double-strand break repair. *Cancer Res*, **70**, 8748-8759.

- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H.R. and Medema, R.H. (2010) Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, **29**, 2281-2291.
- Maher, R.L., Branagan, A.M. and Morrical, S.W. (2011) Coordination of DNA replication and recombination activities in the maintenance of genome stability. *J Cell Biochem*, **112**, 2672-2682.
- Mai, S., Hanley-Hyde, J. and Fluri, M. (1996) c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene*, **12**, 277-288.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **129**, 1261-1274.
- Mao, Y., Okada, S., Chang, L.S. and Muller, M.T. (2000) p53 dependence of topoisomerase I recruitment in vivo. *Cancer Res*, **60**, 4538-4543.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. and Gorbunova, V. (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 1765-1771.
- Masuda, K., Abdelmohsen, K., Kim, M.M., Srikantan, S., Lee, E.K., Tominaga, K., Selimyan, R., Martindale, J.L., Yang, X., Lehrmann, E., Zhang, Y., Becker, K.G., Wang, J.Y., Kim, H.H. and Gorospe, M. (2011) Global dissociation of HuR-mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *Embo J*, **30**, 1040-1053.
- Matsuoka, S., Huang, M. and Elledge, S.J. (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, **282**, 1893-1897.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. and Elledge, S.J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10389-10394.
- Mazan-Mameczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D. and Gorospe, M. (2003) RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8354-8359.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., Pradines, A., Sebti, S. and Favre, G. (2004) Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res*, **10**, 2742-2750.
- Mazieres, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S.M., Favre, G. and Pradines, A. (2005) Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res*, **304**, 354-364.
- Mazieres, J., Tovar, D., He, B., Nieto-Acosta, J., Marty-Detraves, C., Clanet, C., Pradines, A., Jablons, D. and Favre, G. (2007) Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer*, **7**, 220.
- McClendon, A.K. and Osheroff, N. (2006) The geometry of DNA supercoils modulates topoisomerase-mediated DNA cleavage and enzyme response to anticancer drugs. *Biochemistry*, **45**, 3040-3050.
- McSherry, T.D. and Mueller, P.R. (2004) Xenopus Cds1 is regulated by DNA-dependent protein kinase and ATR during the cell cycle checkpoint response to double-stranded DNA ends. *Mol Cell Biol*, **24**, 9968-9985.
- Medale-Giamarchi, C., Lajoie-Mazenc, I., Malissein, E., Meunier, E., Couderc, B., Berge, Y., Filleron, T., Keller, L., Marty, C., Lacroix-Triki, M., Dalenc, F., Doisneau-Sixou, S.F. and Favre, G. (2013) RhoB modifies estrogen responses in breast

- cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor. *Breast Cancer Res*, **15**, R6.
- Melchionna, R., Chen, X.B., Blasina, A. and McGowan, C.H. (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, **2**, 762-765.
- Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C.D., Hall, A. and Parker, P.J. (1998) PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J Biol Chem*, **273**, 4811-4814.
- Meng, Z., King, P.H., Nabors, L.B., Jackson, N.L., Chen, C.Y., Emanuel, P.D. and Blume, S.W. (2005) The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2962-2979.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*, **152**, 111-126.
- Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., Favre, G. and Toulas, C. (2005) Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ*, **12**, 492-501.
- Mitin, N., Roberts, P.J., Chenette, E.J. and Der, C.J. (2012) Posttranslational lipid modification of Rho family small GTPases. *Methods Mol Biol*, **827**, 87-95.
- Mondal, N., Zhang, Y., Jonsson, Z., Dhar, S.K., Kannapiran, M. and Parvin, J.D. (2003) Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5016-5024.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E. and Toulas, C. (2008) Alfvbeta3 and alfvbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer*, **123**, 357-364.
- Moon, S.H., Nguyen, T.A., Darlington, Y., Lu, X. and Donehower, L.A. (2010) Dephosphorylation of gamma-H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell Cycle*, **9**, 2092-2096.
- Morris, E.J. and Geller, H.M. (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol*, **134**, 757-770.
- Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.C. and Durocher, D. (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*, **9**, 1019-1026.
- Nakamura, T., Asano, M., Shindo-Okada, N., Nishimura, S. and Monden, Y. (1996) Cloning of the RhoB gene from the mouse genome and characterization of its promoter region. *Biochem Biophys Res Commun*, **226**, 688-694.
- Nam, E.A. and Cortez, D. (2011) ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J*, **436**, 527-536.
- Nam, E.A., Zhao, R., Glick, G.G., Bansbach, C.E., Friedman, D.B. and Cortez, D. (2011) Thr-1989 phosphorylation is a marker of active ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) kinase. *J Biol Chem*, **286**, 28707-28714.
- Nazarov, I.B., Smirnova, A.N., Krutilina, R.I., Svetlova, M.P., Solovjeva, L.V., Nikiforov, A.A., Oei, S.L., Zalenskaya, I.A., Yau, P.M., Bradbury, E.M. and Tomilin, N.V. (2003) Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiat Res*, **160**, 309-317.

- Nitiss, J.L. (2009a) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, **9**, 327-337.
- Nitiss, J.L. (2009b) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, **9**, 338-350.
- Nitiss, J.L., Nitiss, K.C., Rose, A. and Waltman, J.L. (2001) Overexpression of type I topoisomerases sensitizes yeast cells to DNA damage. *J Biol Chem*, **276**, 26708-26714.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A. and Chardin, P. (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, **141**, 187-197.
- O'Connor, P.M., Nieves-Neira, W., Kerrigan, D., Bertrand, R., Goldman, J., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1991) S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells. *Cancer Commun*, **3**, 233-240.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A. and Goodship, J.A. (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*, **33**, 497-501.
- O'Neill, T., Giarratani, L., Chen, P., Iyer, L., Lee, C.H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B.B., Chung, J.H. and Rathbun, G.A. (2002) Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem*, **277**, 16102-16115.
- Ogris, E., Du, X., Nelson, K.C., Mak, E.K., Yu, X.X., Lane, W.S. and Pallas, D.C. (1999) A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, **274**, 14382-14391.
- Pan, Y. and Qian, H. (2005) Interactions between rho and gamma2 subunits of the GABA receptor. *J Neurochem*, **94**, 482-490.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. and Aguilera, A. (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 1039-1056.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, **10**, 886-895.
- Pawelczak, K.S., Bennett, S.M. and Turchi, J.J. (2011) Coordination of DNA-PK activation and nuclease processing of DNA termini in NHEJ. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 2531-2543.
- Peasland, A., Wang, L.Z., Rowling, E., Kyle, S., Chen, T., Hopkins, A., Cliby, W.A., Sarkaria, J., Beale, G., Edmondson, R.J. and Curtin, N.J. (2011) Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*, **105**, 372-381.
- Perez-Sala, D., Boya, P., Ramos, I., Herrera, M. and Stamatakis, K. (2009) The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS One*, **4**, e8117.
- Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H. and Jasin, M. (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev*, **13**, 2633-2638.

- Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A. and Bonner, W.M. (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*, **81**, 123-129.
- Plo, I., Laulier, C., Gauthier, L., Lebrun, F., Calvo, F. and Lopez, B.S. (2008) AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res*, **68**, 9404-9412.
- Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*, **6**, 789-802.
- Pommier, Y. (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev*, **109**, 2894-2902.
- Pommier, Y. (2013) Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*, **8**, 82-95.
- Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., Agama, K., Nitiss, J.L. and Redon, C. (2006) Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **81**, 179-229.
- Pommier, Y. and Cushman, M. (2009) The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. *Mol Cancer Ther*, **8**, 1008-1014.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Laco, G.S., Kroth, H., Sayer, J.M. and Jerina, D.M. (2002) Different effects on human topoisomerase I by minor groove and intercalated deoxyguanosine adducts derived from two polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides at or near a normal cleavage site. *J Biol Chem*, **277**, 13666-13672.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Pourquier, P., Sayer, J.M., Kroth, H. and Jerina, D.M. (2000a) Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in DNA are potent suppressors of a normal topoisomerase I cleavage site and powerful inducers of other topoisomerase I cleavages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2040-2045.
- Pommier, Y., Laco, G.S., Kohlhagen, G., Sayer, J.M., Kroth, H. and Jerina, D.M. (2000b) Position-specific trapping of topoisomerase I-DNA cleavage complexes by intercalated benzo[a]-pyrene diol epoxide adducts at the 6-amino group of adenine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10739-10744.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C. (2010) DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*, **17**, 421-433.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Urasaki, Y., Wu, J. and Laco, G.S. (1999) Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat*, **2**, 307-318.
- Pourquier, P., Bjornsti, M.A. and Pommier, Y. (1998) Induction of topoisomerase I cleavage complexes by the vinyl chloride adduct 1,N6-ethenoadenine. *J Biol Chem*, **273**, 27245-27249.
- Pourquier, P., Gioffre, C., Kohlhagen, G., Urasaki, Y., Goldwasser, F., Hertel, L.W., Yu, S., Pon, R.T., Gmeiner, W.H. and Pommier, Y. (2002) Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res*, **8**, 2499-2504.
- Pourquier, P. and Lansiaux, A. (2011) [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bull Cancer*, **98**, 1287-1298.
- Pourquier, P., Pilon, A.A., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Sharma, A. and Pommier, Y. (1997) Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J Biol Chem*, **272**, 26441-26447.

- Pourquier, P. and Pommier, Y. (2001) Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Adv Cancer Res*, **80**, 189-216.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Fertala, J., Wang, D., Park, H.J., Essigmann, J.M., Bjornsti, M.A. and Pommier, Y. (1999) Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem*, **274**, 8516-8523.
- Pourquier, P., Waltman, J.L., Urasaki, Y., Loktionova, N.A., Pegg, A.E., Nitiss, J.L. and Pommier, Y. (2001) Topoisomerase I-mediated cytotoxicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: trapping of topoisomerase I by the O6-methylguanine. *Cancer Res*, **61**, 53-58.
- Prechtel, A.T., Chemnitz, J., Schirmer, S., Ehlers, C., Langbein-Detsch, I., Stulke, J., Dabauvalle, M.C., Kehlenbach, R.H. and Hauber, J. (2006) Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element. *J Biol Chem*, **281**, 10912-10925.
- Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K. and Johnson, D.G. (2006) ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1446-1451.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, **265**, 23-32.
- Rao, V.A., Conti, C., Guirouilh-Barbat, J., Nakamura, A., Miao, Z.H., Davies, S.L., Sacca, B., Hickson, I.D., Bensimon, A. and Pommier, Y. (2007) Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol Cancer Res*, **5**, 713-724.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2012) [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother*, **16**, 1-10.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 819-824.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S.C. (2007) Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*, **130**, 991-1004.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 162-169.
- Regairaz, M., Zhang, Y.W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I. and Pommier, Y. Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol*, **195**, 739-749.
- Reid, T.S., Terry, K.L., Casey, P.J. and Beese, L.S. (2004) Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J Mol Biol*, **343**, 417-433.
- Ridley, A.J. (2004) Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **84**, 13-19.
- Ridley, A.J. (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, **16**, 522-529.
- Ridley, A.J. (2013) RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc*.
- Riou, P., Villalonga, P. and Ridley, A.J. (2010) Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays*, **32**, 986-992.

- Rivory, L.P., Bowles, M.R., Robert, J. and Pond, S.M. (1996) Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol*, **52**, 1103-1111.
- Robertson, D., Paterson, H.F., Adamson, P., Hall, A. and Monaghan, P. (1995) Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J Histochem Cytochem*, **43**, 471-480.
- Rockstroh, A., Kleinert, A., Kramer, M., Grosse, F. and Soe, K. (2007) Cellular stress triggers the human topoisomerase I damage response independently of DNA damage in a p53 controlled manner. *Oncogene*, **26**, 123-131.
- Roe, J.S., Kim, H.R., Hwang, I.Y., Ha, N.C., Kim, S.T., Cho, E.J. and Youn, H.D. (2011) Phosphorylation of von Hippel-Lindau protein by checkpoint kinase 2 regulates p53 transactivation. *Cell Cycle*, **10**, 3920-3928.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
- Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J.F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. and Tazi, J. (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature*, **381**, 80-82.
- Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167-180.
- Rothkamm, K. and Lobrich, M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5057-5062.
- Sahai, E. and Marshall, C.J. (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 133-142.
- Sakasai, R., Teraoka, H., Takagi, M. and Tibbetts, R.S. (2010) Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. *J Biol Chem*, **285**, 15201-15208.
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M. and Abraham, R.T. (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*, **59**, 4375-4382.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, **450**, 509-514.
- Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Kondo, M., Nagasaka, T., Goto, Y., Gao, W., Ueda, Y., Yokoi, K., Minna, J.D., Osada, H., Kondo, Y. and Sekido, Y. (2007) RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*, **120**, 543-551.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem*, **277**, 14581-14588.
- Schwarz, J.K., Lovly, C.M. and Piwnicka-Worms, H. (2003) Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res*, **1**, 598-609.

- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M. and Barrett, J.C. (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **6**, 168-170.
- Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C. and Bonner, W.M. (2003) Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther*, **2**, 233-235.
- Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I. and Pommier, Y. (2007) The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol*, **27**, 5806-5818.
- Sen, N., Banerjee, B., Das, B.B., Ganguly, A., Sen, T., Pramanik, S., Mukhopadhyay, S. and Majumder, H.K. (2007) Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. *Cell Death Differ*, **14**, 358-367.
- Seol, Y., Zhang, H., Pommier, Y. and Neuman, K.C. (2012) A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 16125-16130.
- Shao, R.G., Cao, C.X., Zhang, H., Kohn, K.W., Wold, M.S. and Pommier, Y. (1999) Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *Embo J*, **18**, 1397-1406.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
- Shiloh, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci*, **31**, 402-410.
- Shiloh, Y. and Ziv, Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 197-210.
- Shykind, B.M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J.J. and Sharp, P.A. (1997) Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev*, **11**, 397-407.
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M. and Saito, K. (2008) Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6782-6786.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N. and Gillespie, D.A. (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*, **108**, 73-112.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J., Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, **266**, 1376-1380.
- Soe, K., Rockstroh, A., Schache, P. and Grosse, F. (2004) The human topoisomerase I damage response plays a role in apoptosis. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 387-393.
- Sordet, O., Goldman, A., Redon, C., Solier, S., Rao, V.A. and Pommier, Y. (2008a) Topoisomerase I requirement for death receptor-induced apoptotic nuclear fission. *J Biol Chem*, **283**, 23200-23208.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (2003) Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **3**, 271-290.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Plo, I., Pourquier, P., Urasaki, Y., Yoshida, A., Antony, S., Kohlhagen, G., Solary, E., Saparbaev, M., Laval, J. and Pommier, Y. (2004a) Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J Biol Chem*, **279**, 50499-50504.

- Sordet, O., Khan, Q.A. and Pommier, Y. (2004b) Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by oxygen radicals and mitochondrial dysfunction. *Cell Cycle*, **3**, 1095-1097.
- Sordet, O., Larochelle, S., Nicolas, E., Stevens, E.V., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P. and Pommier, Y. (2008b) Hyperphosphorylation of RNA polymerase II in response to topoisomerase I cleavage complexes and its association with transcription- and BRCA1-dependent degradation of topoisomerase I. *J Mol Biol*, **381**, 540-549.
- Sordet, O., Liao, Z., Liu, H., Antony, S., Stevens, E.V., Kohlhagen, G., Fu, H. and Pommier, Y. (2004c) Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 33968-33975.
- Sordet, O., Nakamura, A.J., Redon, C.E. and Pommier, Y. (2010) DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*, **9**, 274-278.
- Sordet, O., Redon, C.E., Guirouilh-Barbat, J., Smith, S., Solier, S., Douarre, C., Conti, C., Nakamura, A.J., Das, B.B., Nicolas, E., Kohn, K.W., Bonner, W.M. and Pommier, Y. (2009) Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep*, **10**, 887-893.
- Sordet, O. and Solier, S. (2012) Topoisomerases and Apoptosis. In Pommier Y (ed) DNA Topoisomerases and Cancer, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J. and Lukas, J. (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, **3**, 247-258.
- Soret, J., Gabut, M., Dupon, C., Kohlhagen, G., Stevenin, J., Pommier, Y. and Tazi, J. (2003) Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer Res*, **63**, 8203-8211.
- Srikantan, S. and Gorospe, M. (2011) UneCLIPsing HuR nuclear function. *Mol Cell*, **43**, 319-321.
- Srougi, M.C. and Burridge, K. (2011) The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One*, **6**, e17108.
- Stevens, C., Smith, L. and La Thangue, N.B. (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, **5**, 401-409.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G. and Champoux, J.J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**, 1534-1541.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, **64**, 2390-2396.
- Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A. (2006) ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *Embo J*, **25**, 5775-5782.
- Stolz, A., Ertych, N. and Bastians, H. (2010) Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res*, **17**, 401-405.

- Stone, S.R., Hofsteenge, J. and Hemmings, B.A. (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, **26**, 7215-7220.
- Stracker, T.H. and Petrini, J.H. (2011) The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 90-103.
- Stracker, T.H., Roig, I., Knobel, P.A. and Marjanovic, M. (2013) The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet*, **4**, 37.
- Subbaramaiah, K., Marmo, T.P., Dixon, D.A. and Dannenberg, A.J. (2003) Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. *J Biol Chem*, **278**, 37637-37647.
- Subramanian, D., Rosenstein, B.S. and Muller, M.T. (1998) Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res*, **58**, 976-984.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E.M. and Kowalczykowski, S.C. (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem*, **272**, 7940-7945.
- Sun, G., Li, H. and Rossi, J.J. (2010) Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res*, **38**, 239-252.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. and Price, B.D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13182-13187.
- Takagi, K., Dexheimer, T.S., Redon, C., Sordet, O., Agama, K., Lavielle, G., Pierre, A., Bates, S.E. and Pommier, Y. (2007) Novel E-ring camptothecin keto analogues (S38809 and S39625) are stable, potent, and selective topoisomerase I inhibitors without being substrates of drug efflux transporters. *Mol Cancer Ther*, **6**, 3229-3238.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M. and Nakayama, K. (2000) Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev*, **14**, 1439-1447.
- Takemura, H., Rao, V.A., Sordet, O., Furuta, T., Miao, Z.H., Meng, L., Zhang, H. and Pommier, Y. (2006) Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, **281**, 30814-30823.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. and Miki, T. (1999) Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol*, **147**, 921-928.
- Tovar, D., Faye, J.C. and Favre, G. (2003) Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics*, **81**, 525-530.
- Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A. and Pasero, P. (2009) Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol*, **11**, 1315-1324.
- Turtoi, A., Brown, I., Oskamp, D. and Schneeweiss, F.H. (2008) Early gene expression in human lymphocytes after gamma-irradiation-a genetic pattern with potential for biodosimetry. *Int J Radiat Biol*, **84**, 375-387.

- Urasaki, Y., Takebayashi, Y. and Pommier, Y. (2000) Activity of a novel camptothecin analogue, homocamptothecin, in camptothecin-resistant cell lines with topoisomerase I alterations. *Cancer Res*, **60**, 6577-6580.
- Usui, H., Inoue, R., Tanabe, O., Nishito, Y., Shimizu, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Takeda, M. (1998) Activation of protein phosphatase 2A by cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of the 74-kDa B" (delta) regulatory subunit in vitro and identification of the phosphorylation sites. *FEBS Lett*, **430**, 312-316.
- Vahteristo, P., Bartkova, J., Eerola, H., Syrjakoski, K., Ojala, S., Kilpivaara, O., Tamminen, A., Kononen, J., Aittomaki, K., Heikkila, P., Holli, K., Blomqvist, C., Bartek, J., Kallioniemi, O.P. and Nevanlinna, H. (2002) A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet*, **71**, 432-438.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M. and Bonassi, S. (2013) gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res*.
- van der Giessen, K., Di-Marco, S., Clair, E. and Gallouzi, I.E. (2003) RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, **278**, 47119-47128.
- Vardouli, L., Moustakas, A. and Stournaras, C. (2005) LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **280**, 11448-11457.
- Vega, F.M. and Ridley, A.J. (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, **582**, 2093-2101.
- Vilenchik, M.M. and Knudson, A.G. (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12871-12876.
- Walker, K. and Olson, M.F. (2005) Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 62-68.
- Wall, M.E. and Wani, M.C. (1995) Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, **55**, 753-760.
- Wang, D.A. and Sebt, S.M. (2005) Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J Biol Chem*, **280**, 19243-19249.
- Wang, H., Hota, P.K., Tong, Y., Li, B., Shen, L., Nedyalkova, L., Borthakur, S., Kim, S., Tempel, W., Buck, M. and Park, H.W. (2011) Structural basis of Rnd1 binding to plexin Rho GTPase binding domains (RBDs). *J Biol Chem*, **286**, 26093-26106.
- Wang, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 430-440.
- Wang, Q., Gao, F., Wang, T., Flagg, T. and Deng, X. (2009) A nonhomologous end-joining pathway is required for protein phosphatase 2A promotion of DNA double-strand break repair. *Neoplasia*, **11**, 1012-1021.
- Wang, S., Yan-Neale, Y., Fischer, D., Zeremski, M., Cai, R., Zhu, J., Asselbergs, F., Hampton, G. and Cohen, D. (2003) Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene*, **22**, 6204-6213.
- Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A. and Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene*, **342**, 85-95.

- Wennerberg, K. and Der, C.J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, **117**, 1301-1312.
- Wennerberg, K., Forget, M.A., Ellerbroek, S.M., Arthur, W.T., Burrige, K., Settleman, J., Der, C.J. and Hansen, S.H. (2003) Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*, **13**, 1106-1115.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, **118**, 843-846.
- Westermarck, J. and Hahn, W.C. (2008) Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*, **14**, 152-160.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B. and Malter, J.S. (2005) RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene*, **24**, 502-511.
- Wheeler, A.P. and Ridley, A.J. (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*, **301**, 43-49.
- Woods, D. and Turchi, J.J. (2013) Chemotherapy induced DNA damage response: Convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther*, **14**.
- Wu, J. and Liu, L.F. (1997) Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4181-4186.
- Wu, X., Webster, S.R. and Chen, J. (2001) Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem*, **276**, 2971-2974.
- Wunnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hashimoto, C. and Cho, K.W. (1999) Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development*, **126**, 5339-5351.
- Wyman, C. and Kanaar, R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, **40**, 363-383.
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J.E. and Kim, M.K. (2002) PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol*, **4**, 865-870.
- Yoneda, M., Hirokawa, Y.S., Ohashi, A., Uchida, K., Kami, D., Watanabe, M., Yokoi, T., Shiraishi, T. and Wakusawa, S. (2010) RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp Mol Pathol*, **88**, 90-95.
- Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A. and Olofsson, B. (1995) Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene*, **10**, 1935-1945.
- Zeng, P.Y., Rane, N., Du, W., Chintapalli, J. and Prendergast, G.C. (2003) Role for RhoB and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors. *Oncogene*, **22**, 1124-1134.
- Zhang, Y.W., Regairaz, M., Seiler, J.A., Agama, K.K., Doroshov, J.H. and Pommier, Y. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **39**, 3607-3620.
- Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*, **21**, 4129-4139.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-439.
- Zhou, J., Pham, H.T., Ruediger, R. and Walter, G. (2003) Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *Biochem J*, **369**, 387-398.

- Zhou, J., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, N., Sun, L., Liu, M., Qiu, M., Luo, D., Tang, Q., Liao, Z., Zheng, Y. and Bi, F. (2011) A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int J Cancer*, **128**, 1057-1068.
- Zhu, H., Zhou, H.L., Hasman, R.A. and Lou, H. (2007) Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J Biol Chem*, **282**, 2203-2210.
- Zohn, I.M., Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L. and Der, C.J. (1998) Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene*, **17**, 1415-1438.

RESUME

Rôle de la GTPase RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par la camptothécine.

RhoB est une GTPase impliquée dans diverses fonctions intracellulaires comme l'organisation du cytosquelette. En plus de ses rôles bien établis, RhoB a récemment émergé comme un gène de réponse précoce aux dommages à l'ADN. RhoB est surexprimée et activée en réponse à divers génotoxiques bien que les mécanismes d'induction et la relevance fonctionnelle de cette induction restent mal compris. RhoB possède également des propriétés de suppresseur de tumeurs. Son expression diminue lors de la progression tumorale et la perte de RhoB favorise la prolifération cellulaire et l'invasion. Pour étudier le rôle de RhoB dans la réponse aux dommages à l'ADN et son implication potentielle dans la progression tumorale, nous avons utilisé la camptothécine (CPT), un inhibiteur sélectif de la topoisomérase I qui produit des cassures double-brin (DSBs) de l'ADN. Nous montrons que, dans les cellules traitées par la CPT, les DSBs induisent l'expression de RhoB par un mécanisme qui dépend de Chk2 et de son substrat HuR qui se lie à l'ARNm de RhoB et prévient sa dégradation. Des cellules déficientes en RhoB présentent un défaut de déphosphorylation de γ -H2AX après le retrait de la CPT, suggérant un défaut de réparation des DSBs. Ces cellules présentent également une diminution de l'activité de PP2A, une phosphatase pour γ -H2AX et d'autres protéines de la signalisation et de la réparation des dommages à l'ADN. Nous proposons que les DSBs activent une voie Chk2-HuR-RhoB qui favorise la déphosphorylation de γ -H2AX par PP2A. Enfin, nous montrons que les cellules déficientes en RhoB accumulent du γ -H2AX endogène et des anomalies chromosomiques, suggérant que la perte de RhoB augmente l'instabilité génomique induite par les DSBs et la progression tumorale.

Mots clés : RhoB, cassure double-brin, Chk2, γ -H2AX, PP2A, HuR, réparation de l'ADN, stabilité du génome.